

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
Keemia instituut

TANEL SÕRMUS

**cAMP-SÕLTUVA PROTEIINKINAASI  
FOTOLAGUNDATAV INHIBIITOR**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: teadur Kaido Viht

Tartu 2015

Kasutatud lühendid:

Ac – atsetüül

ACN – atsetonitriil

Adc – adensiini-5`-karboksüülhape

ADP – adensiin-5`-difosfaat

Ahx – 6-aminoheksaanhape

ANFA – 4-[4-(1-aminoetüül)-2-metoksü-5-nitrofenoksü]butaanhape

ARC – adensiini analoogi ja oligoarginiini konjugaat

ATP – adensiin-5`-trifosfaat

BSA – veiseseerumi albumiin

cAMP – tsükliline adensiin-3',5'-monofosfaat

DCE – dikloroetaan

DHB – dihidroksübensoehape

DMACM – dimetoksükumariin-4-üülmetüül

DMF – dimetüülformamiid

DMSO – dimetüülsulfoksiid

DNA – desoksüribonukleiinhape

DTT – ditiotreitol

FA – fluorestsentsanisotroopia

FP – fluorestsentspolarisatsioon

Fmoc – fluorenüülmetüüloksükarbonüül

HBTU – *O*-bensotriasool-*N,N,N',N'*-tetrametüüluroonium heksafluorofosfaat

HEPES – (4-(2-hüdoksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape

HOBt – hüdoksübensotriasool

HPLC-MS – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia masspektromeetria

*IC*<sub>50</sub> – kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest

MALDI-TOF – lennuaja maatriks-laserdesoptsioonionisatsioon

mRNA – info-ribonukleiinhape

MQ – ülipuhas vesi (Milli-Q®)

2-NB – 2-nitrobensüül

NMM – *N*-metüülmorfoliin

Nda – nonaandihape

Pbf – 2,2,4,6,7-pentametüüldihüdrobensofuraan-5-sulfonüül

PIPY – 6-(piperasiin-1-üül)-7-deasapuriini

PK – proteiinkinaas

PKA – cAMP-sõltuv proteiinkinaas, proteiinkinaas A

PKAc – proteiinkinaas A katalüütiline alaühik

PKAr – proteiinkinaas A regulatiivne alaühik

PP – polüpropüleen

TAMRA – tetrametüülrodamiin

TIPS – triisopropüülsilaan

TGL – aeglahutusega luminestsents

TFA – trifluoroäädikhape

TMR – tuumamagnetresonantsspektroskoopia

UV-Vis – ultraviolet ja nähtav valgus

# Sisukord

1. Sissejuhatus .....	5
2. Kirjanduse ülevaade .....	6
2.1 Proteiinkinaasid .....	6
2.2 Proteiinkinaas A (PKA) .....	7
2.3 Proteiinkinaasi inhibiitorid .....	8
2.4 ARC-inhibiitorid .....	9
2.5 Fotoluminestsentskiirgus .....	10
2.6 Fluorestsentsanisotroopia .....	11
2.7 Aeglahutusega fotoluminestsents .....	13
2.8 Fotoreguleeritavad bioaktiivsusega ühendid .....	14
3. Eksperimentaalne osa .....	17
3.1 Aparatuur ja töövahendid .....	17
3.2 Kasutatud kemikaalid .....	18
3.3 6-(piperasiin-1-üül)-7-deasapuriini süntees .....	19
3.4 Peptiidisüntees tahkel faasil .....	19
3.5 Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine .....	21
3.6 cAMP-sõltuval proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine .....	21
3.7 Kiiritamise katsed .....	23
4. Tulemused ja arutelu .....	24
4.1 Bioloogilised katsed .....	27
4.2. Kiiritatud ühendite iseloomustamine .....	30
5. Kokkuvõte .....	35
6. Summary .....	36
7. Kasutatud Kirjandus .....	37
8. Lisad .....	41

# 1. Sissejuhatus

Proteiinkinaasid katalüüsivad valkude fosforüülimist ja vahendavad seeläbi pea kõiki raku funktsioone. Proteiinkinaaside ülemäärane aktiivsus on seotud mitmete tõsiste haigustega, sealhulgas vähi, arvukate põletikuliste ja neuroloogiliste haigustega, ning seetõttu pakub proteiinkinaaside uurimine huvi ravimitööstustele.

Tartu Ülikoolis on välja töötanud ARC (adesnosiini-oligoarginiini konjugaat) tüüpi proteiinkinaasi inhibiitoreid, mis paistavad silma eriti hea seondumisvõime ja selektiivsuse poolest.

Valgus on paljude eluks vajalike keemiliste, bioloogiliste ja füüsikaliste protsesside nagu näiteks fotosüntees, fotolüüs, erinevad oksüdatsiooni ja reduktsiooni protsessid aluseks. Silmades on fotoretseptorrakud, tänu millele saame erakordse ettekujutuse maailmast 400–700 nanomeetrise lainepikkuste kaudu. Fotokeemias võib valgust ette kujutada kui lähteainet, mis võtab osa keemilisest reaktsioonist, erinevusega et valguse ruumilist paiknevust, kestvust ja intensiivust on võimalik väga täpselt reguleerida. Valgus on võimas regulatiivne vahend, mille oskuslikust kasutamisest oleks inimkonnale palju kasu.

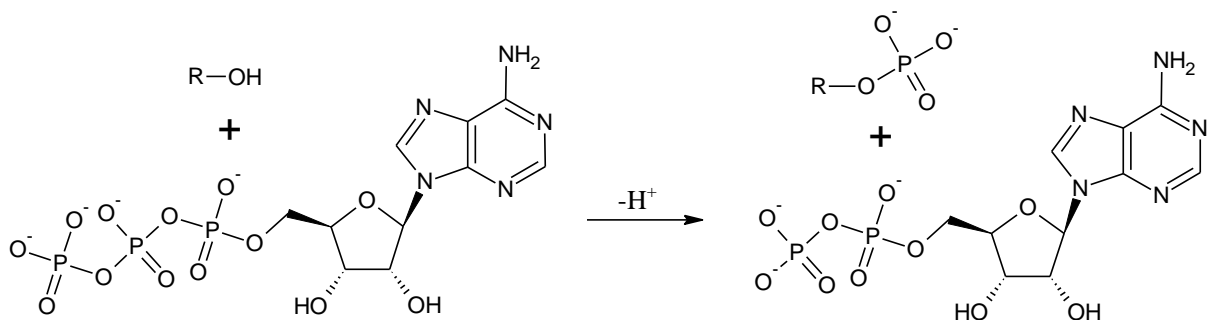
Fotoaktiveeritavate bioaktiivsete ühenditega on aktiivselt tegeletud juba viimased 30 aastat, kuid vähem on uuritud fotoinaktiveeritavaid ühendeid. Bioloogilise aktiivsuse väljalülitamise võimalust pakkuvate proteiinkinaasi inhibiitoritega oleks uuringutes võimalik ajutiselt blokeerida kinaasi aktiivsust. Inhibiitorit rakkudele lisades oleks võimalik proteiinkinaasi välja lülitada ning hiljem taas kiiritamisega aktiveerida. Selline võimalus oleks huvitav rakukatsetes signaalradade uurimiseks, aga ka afiinsuskromatograafias kinaasi väljakorjamiseks ja pärast efektiivseks lahtilaskmiseks.

Käesoleva töö eesmärgiks on arendada valgusega inaktiveeritavaid ARC inhibiitoreid ning uurida nende bioloogilist aktiivsust.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid (PK) on ensüümid, mis katalüüsivad valkude fosforüülimist. Fosforüülimisreaktsiooni käigus kantakse nukleosiidtrifosfaadi (peamiselt ATP e adenosiini-5'-trifosfaadi) terminaalne fosforüülrühm valgu aminohappe jäägile (seriini, treoniini või türosiini puhul hüdroksüülrühmale, mille tulemusel moodustub fosforhappe ester) (Skeem 1). [1]



**Skeem 1.** ATP terminaalse fosforüülrühma ülekanne aminohappe jäägile [1].

Fosforüülrühm suudab tekitada tugevaid vesiniksidemeid, tal on füsioloogilisel pH-l (7,3–7,4) negatiivne laeng ( $pK_a = 2,2; 5,8$  [2]) ning juba ainsa fosforüülrühma ülekanne valgule kui posttranslatoorne modifikatsioon võib aktiveerida mitmeid molekulidesiseseid ja -väliseid interaktsioone. Kokku kodeerib inimgenoom 538 PK-d (~2 kogu genoomist), millest enamik katlüüsivad seriini (85 %) või treoniini (11,8 %), vähesed türosiini (1,8 %) jääkide fosforüülimist, kuid mõned PK-d fosforüülivad ka mõlemat tüüpi hüdroksüülrühmi. Vähem on uuritud valkude *N*-fosforüülimist, mille korral seondub fosfaatrühm histidiini, lüsiini või arginiini jäägi lämmastikule (tekib fosfoamidaatrühm). [1,2]

PK-d liigitatakse katalüütilise domeeni struktuuri järgi seitsmesse suuremasse rühma: TK (Tyrosine Kinase), TKL (Tyrosine Kinase Like), CMGC (the Cyclin-dependant kinases, MAP kinases, Glycogen synthase kinases, Casein kinases), AGC (PKA, PKG, PKC), CAMK (Calcium/calModulin-dependent Kinases), STE (homologs of yeast Sterile 7, Sterile 11, STErile 20 kinases) ja CK1 (Casein Kinases I) [3].

PK katalüütilises aktiivtsentris on kaks sidumiskiirkonda, millest ühte seondub ATP ja teise valgusubstraat [4]. Pärast seondumist toimub fosforüülrühma ülekanne ATP-lt aminohappe jäägile [5]. Fosforüülimise katalüütilise akti kiiruse määrab fosfaatrühma ülekande kiirusest 20 korda aeglasem ADP dissotsiatsioon [4]. PK-de sidumistasku on hästi konserveerunud ehk kõigil kinaasidel sarnase struktuuriga, mistõttu fosforüülrühma doonor

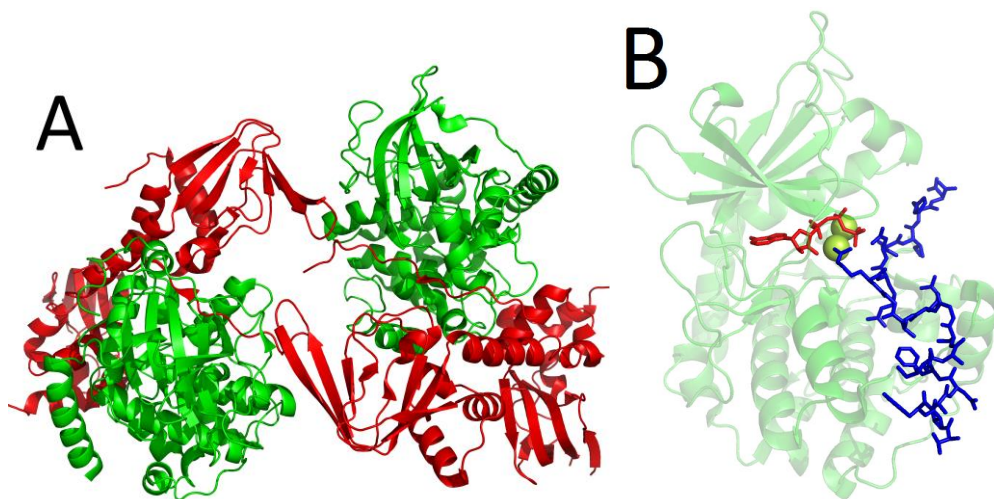
on PK-de fosforüülimisprotsessides harilikult ATP. Substraatvalke tuntakse ära konsensusjärjestuse alusel, mis kujutab endast valgu primaarstruktuuri fosforüülitava aminohappejäägi ümbruses [5].

PK-d mõjutavad valkude aktivatsiooni, valkude lokaliseerimise, degradatsiooni, püsivust ja valk-valk-interaktsioone [2,3]. Kuna PK-d on laialdaselt ja tihedalt seotud rakuregulatsiooni protsessidega ning PK-de funktsioneerimise defekte seostatakse üle 400 haigusega (sealhulgas vähk ja põletikulised ning neuroloogilised haigused), siis on need ensüümid olulisteks ravimite sihtmärkideks [4,6].

## **2.2 *Proteiinkinaas A (PKA)***

PKA on tsüklilisest adenosin-3',5'-monofosfaadist (cAMP-ist) sõltuv PK, mida leidub kõikides imetajate rakkudes (Joonis 1A). PKA kuulub 60-liikmelisse AGC kinaaside rühma ning on basofiilne PK – tema fosforüülitavate valkude fosforüülitavate aminohappejääkide läheduses on positiivselt laetud aminohappejäägid [4,5]. PKA-le vastav konsensusjärjestus on -Arg-Arg-X-Ser/Thr-B-, kus X on määratlemata aminohape ning B on hüdrofoobne aminohappe jääk. [5,7]

PKA on heterotetrameerne holoensüüm ( $R_2C_2$ ), mis koosneb reguleerivate alaühikute dimeerist  $R_2$  (PKAr) ja kahest katalüütilisest alaühikust 2C (PKAc) (Joonis 1A). G-valguga seotud retseptorite kaudu aktiveeritud adenülaatsüklaas katalüüsib ATP üleminekut sekundaarseks virgatsaineeks cAMP-ks, mille kontsentratsiooni tõus rakus muudab PKA aktiivseks [8]. Nelja cAMP-i molekuli seondumisel  $R_2$  dimeeriga PKA holoensüüm dissotseerub, mille tulemusel PKA muutub katalüütiliselt aktiivseks (holoensüümist eraldub kaks katalüütilist alaühikut) [7,5]. PKA katalüütiline alaühik PKAc on globulaarne valk molekulmassiga ~40 000 Da (Joonis 1B). Aktivatsiooniks on vajalik ka PKAc fosforüülimine aminohappe jäägi Thr197 juures [8]. PKAc aktiivsenter (katalüütilise alaühiku piirkond) asub N ja C terminaalsete sagarate vahelises lõhes [5,9].



**Joonis 1. A)** PKA heterotetrameerse holoensüümi kristallstruktuur – rohelisena on kujutatud kaks katalüütilist alaühikut (C) ja punaselt reguleerivate alaühikute dimeer ( $R_2$ ) (PDB 3TNP) [10].

**B)** PKA katalüütiline alaühik C, kus punaselt on tähistatud sidumistaskus asuv ATP ja siniselt valgu sidumispiirkonda seondunud inhibiitoripeptiid IP20 (TTYADFIASGRTGRRNAIHD), rohelised kerad tähistavad magneesiumiioone (PDB 4DH3) [11].

### 2.3 Proteiinkinaasi inhibiitorid

Inhibiitorid on bioaktiivsed ühendid, mis seondumisel ensüümiga vähendavad selle aktiivsust ning seeläbi aeglustavad või peatavad ensüümreaktsiooni. PK inhibiitorid moodustavad kuni 30 % ravimiavastusprogrammidest ning mitusada inhibiitorit on kliinilisel testimisel [12]. Aastal 2001 sisenes turule esimene majanduslikult edukas PK inhibiitor imatiniib (Gleevec), mida kasutatakse kroonilise müeloidse leukeemia ravimiseks. Imatiniibi edu on innustanud farmakoloogia tööstust investeerima PK inhibiitoritesse ning 2014 novembri seisuga oli ravimiturule jõudnud 30 kinaasi inhibiitorit. Lisaks ravimiarendusele on PK inhibiitorite väljatöötamine oluline ka bioloogiliste süsteemide paremaks mõistmiseks näiteks signaalülekanderadade uurimiseks rakkudes [12,13].

PK inhibiitoreid klassifitseeritakse selle järgi, kas nad tunnevad ära PK aktiivse või inaktiivse konformatsiooni, seonduvad konkurentselt või allosteeriliselt, kovalentselt või pöördvalt [14]. Substraadi konkurentne PK inhibiitor seondub ATP või valk-substraadi asemel kinaasi katalüütilisse aktiivtsentrisse ning takistab seeläbi valgu fosforüülimist. Enamus ravimiarenduses väljatöötatud PK inhibiitoreid on pöörduvad ja ATP-konkurentsed, kuna selliste struktuuride eeliseks on kõrge seondumisvõime saavutamine väikeste molekulmassidega struktuuridega. Kuna ATP tasku on kõigil PK-del sarnase struktuuriga, siis on kõrge selektiivsusega inhibiitorite loomine raskendatud. Samas ei ole ravimi arenduseks absoluutne selektiivsus alati vajalik [15].



Inhibiitorite iseloomustamiseks kasutatakse tihti peale inhibiitori kontsentratsiooni väärtust, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest ( $IC_{50}$ ). Pöörduvate ATP-konkurentsete inhibiitorite  $IC_{50}$  sõltub nii inhibiitori  $K_i$  väärtusest kui ka ATP kontsentratsioonist rakus. Cheng-Prusoff'i võrrandi abil näeme, kuidas kõrge ATP kontsentratsioon rakus (1–5 mM) vähendab ATP-konkurentsete inhibiitorite *in vivo* efektiivsust (Võrrand 1) [12].  $IC_{50}$  on lineaarses sõltuvuses ATP kontsentratsioonist. PK-de  $K_{M,ATP}$  väärtused jäävad vahemikku 2–600  $\mu$ M (PKA  $K_{M,ATP}$  = 25  $\mu$ M) [12].

$$IC_{50} = K_i \left( 1 + \frac{[ATP]}{K_{M,ATP}} \right) \quad (1),$$

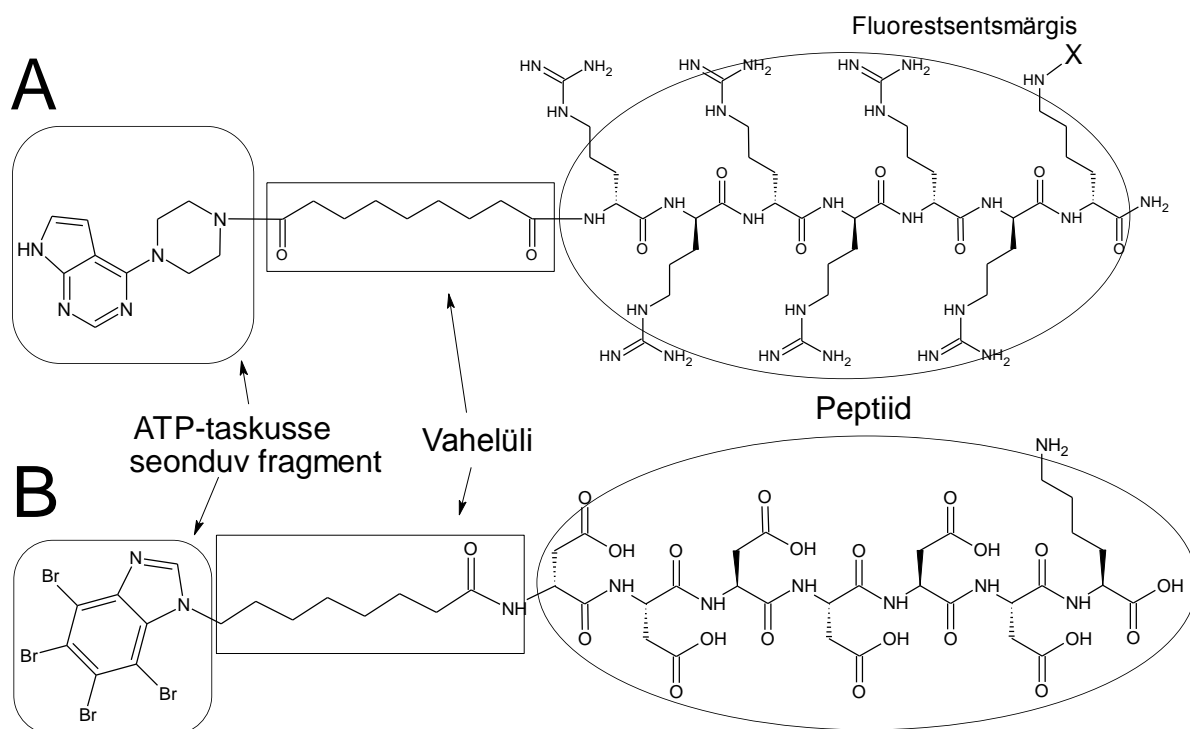
kus  $IC_{50}$  – kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest inhibeerimisest,  $K_i$  – inhibeerimiskonstant,  $[ATP]$  – ATP kontsentratsioon rakus,  $K_{M,ATP}$  – Michaelise konstant ATP jaoks.

PK-ga seandumisel kõrgema selektiivsuse ja seandumisvõime saavutamiseks kasutatakse bisubstraatseid inhibiitoreid, mille puhul inhibiitor seondub samaaegselt nii ATP kui ka valgu sidumistaskusse. Erinevatesse sidumistaskutesse samaaegselt seonduvad struktuuriesad on omavahel seotud vahelüluga [12,16].

## 2.4 ARC-inhibiitorid

Adenosini-oligoarginiini konjugaadid (ARC) on Tartu Ülikoolis sünteesitud bisubstraatsed PK-de inhibiitorid [16]. ARC-d koosnevad painduva ahelaga (vahelüluga) seotud adenosini analoogist, mis seondub PK ATP taskusse, ning PK konsensusjärjestust jäljendavast peptiidist, mis seondub valgu sidumispirkonda [17]. ARC-inhibiitoreid on disainitud nii basofiilsete (nt PKA), kui ka atsetofiilsete PK-de (nt CK2) jaoks (Joonis 2). Bisubstraatsete ARC inhibiitorite põhiline eelis teiste inhibiitorite ees on võime tekitada ensüümiga rohkem sidemeid ja sellest tuleneb nende kõrgem seandumisvõime ning selektiivsus [16]. Parimate ARC-ide seandumisvõime küündib pikomolaarsete kontsentratsioonideni ( $K_D < 100$  pM) [17]. Adenosidi analoogi ning D-arginiinirikka peptiidfragmendiga ARC-idel on hea keemiline ja bioloogiline püsivus ning head raku plasmamembraani läbivad omadused (positiivselt laetud arginiinidega). ARC-tüüpi inhibiitoritele on võimalik fluorestsentsmärgise lisamine, ilma et langeks inhibiitori afiinsus. See omadus võimaldab välja töötada fluorestsentsipõhiseid meetodeid proteiinkinaaside määramiseks [18]. Lisaks on ARC-ide sünteesitavad tahke faasi sünteesimeetodite abil ning tänu molekulis sisalduvale aromaatssele

süsteemile omavad need ühendid tugevat neeldumist ja on optiliselt kvantifitseeritavad. [19,20]



**Joonis 2.** A - basofiilse PK (PKAc) bisubstraatses ARC-inhibiitori struktuur ARC-1411 näitel [21]. B - atsidoofiilse PK (CK2) bisubstraatses ARC-inhibiitori struktuur ARC-1502 [22].

## 2.5 Fotoluminestsentskiirgus

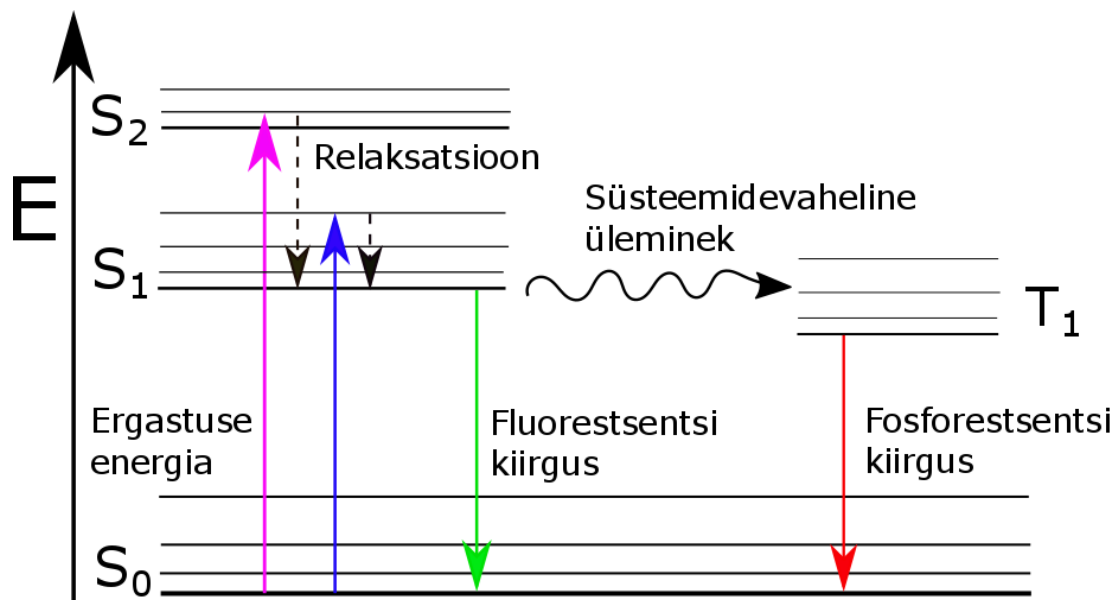
Luminestsents on iseeneslikult emiteeruv kiirgus elektroonselt või vibratsiooniliselt ergastatud ühendilt, mis ei ole soojuslikus tasakaalus ümbritseva keskkonnaga [23]. Fotoluminestsentsi käigus neelab fluorestseeruv molekul ehk fluorofoor kõrgema energiaga (lühikesel lainepikkusel) footoni ning kiirgab madalama energiaga (kõrgemal lainepikkusel) footoni [24,25]. Fluorestsentskiirguse kustumise kiirust iseloomustatakse fluorestsentsielueaga, mis on arvutatav võrrandist:

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2),$$

kus  $I$  – intensiivsus ajahetkel  $t$ ,  $I_0$  – algintensiivsus,  $\tau$  – fluorofoori eluiga ja  $t$  – aeg [26]. Fluorestsents on lühikese elueaga luminestsentsi alaliik, mis kiirgab ajavahemikus ligikaudu  $10^{-8}$  sekundit (10 nanosekundit). Teine fotoluminestsentsi alaliik on pika elueaga fosforestsents, mille emiteeritav kiirgus võib kesta kuni  $10^{-3}$  sekundit (10 millisekundit). [24,27]

Fluorestsentsile on iseloomulik, et valguskvandi neeldumine toimub kiirgumisest kõrgemal energial ja lühematel lainepikkusel – emisioonimaksimum nihkub ergastusmaksimumiga võrreldes kõrgematele lainepikkustele (Stokesi nihe). Samuti

iseloomustab fluorestsentsi Kasha reegel, mille järgi fluorofoori kiirgumisspektri kuju on sõltumatu ergastuslainepikkusest. See tähendab, et elektroni ergastamisel kõrgematele vibratsioonilistele tasemetele eraldub liigne energia lühikese ajavahemiku jooksul ( $10^{-12}$  s) soojusena, mille käigus elektron siirdub kõige madalamale ergastusnivoole [27].



**Joonis 3.** Fotoluminestsentsi nähtusi kirjeldav Jablonski diagramm [27].

Fotoluminestsentsi nähtusi kirjeldab Jablonski diagramm (Joonis 3). Kiiritamisel neeldumisspektrile vastaval lainepikkusel neelab fluorofoor valguskvandi. Põhiolekus ( $S_0$ ) asuva fluorofoori energia kasvab ning elektron ergastub kõrgemale mitmete vibratsiooniliste alamnivoodega energiatasemele (nt  $S_1^*$ ,  $S_2^*$ , jne). Seejärel relakseerub elektron kiirelt ( $\sim 10^{-10}$  s) kõige madalamale vibratsioonilisele alamnivoole ( $S_1$ ), mille käigus liigne energia hajub soojusena. Madalaimalt ergastatud nivoolt naaseb fluorofoor viimaks tagasi põhiolekusse ( $S_0$ ) kiirates ülejäänud energia soojust või fluorestsentskiirgusena. Võimalik on ka, et molekulid siirduvad ergastusnivoolt  $S_1$  süsteemidevahelise ülemineku teel tripletseks olekusse. Molekulide tripletsest olekust põhiolekusse siirdumisel kiirgub fosforestsents. [24,25,27]

## 2.6 Fluorestsentsanisotroopia

Fluorestsentsanisotroopia (FA) meetod põhineb fluorofooride fotoselektiivsel ergastamisel polariseeritud valgusega. Ergastuse tõenäosus sõltub ergastusdipoolide ja valguse polarisatsioonitasandi vahelisest nurgast. Ergastatud molekulide pöörlemise tõttu muutub ka kiiratud valguse polarisatsioonitasand võrreldes ergastuskiirguse polarisatsioonitasandiga, mille tõttu summaarse emiteeritud kiirguse polariseeritus väheneb. Depolarisatsiooni ulatus sõltub sellest, millisel määral jõuab fluorofoor oma ergastatud eluea jooksul lahuses pöörelda.

Enamikel fluorofooridel kulub lahuses pöörlemiseks ainult ~0,05–0,1 nanosekundit, samas kui nende ergastatud eluead kestavad ~1–10 nanosekundit. Kuna sellised fluorofoorid jõuavad oma ergastatud eluea jooksul lahuses mitmeid kordi keerelda, siis emiteeritud kiirguse FA väärtused on madalad. FA väärtused suurenevad fluorofooride seondumisel valkudega, kuna valgud pöörlevad lahuses aeglaselt (nt 50 ns) ning kiiratud valguse polarisatsioon jääb samaks, mis ergastaval valgusel (ergastusdipoolide asend ei jõua muutuda) (Joonis 4). [23,27]

FA arvutamiseks kasutatakse võrrandit [27]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3),$$

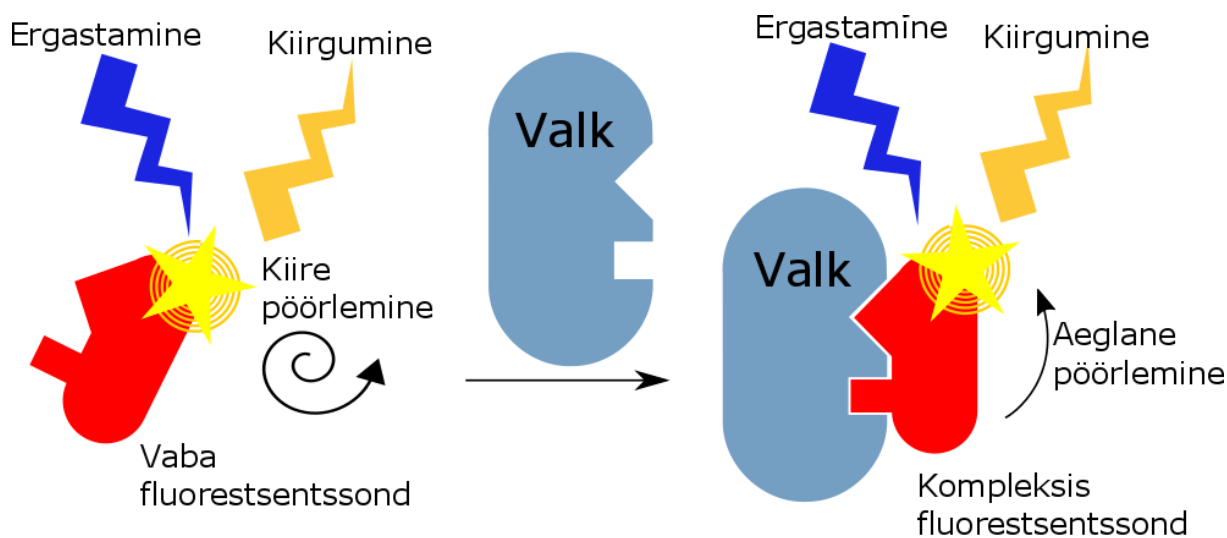
kus  $r$  – anisotroopia,  $I_{\parallel}$  ja  $I_{\perp}$  – emiteeritud kiirguste intensiivsused, mõõdetuna paralleelselt ( $\parallel$ ) või risti ( $\perp$ ) ergastuskiirguse polarisatsioonitasandi suhtes. Fluorestsentspolarisatsiooni (FP) kirjeldab võrrand [27]:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (4),$$

kus  $P$  – polarisatsioon. FP ja FA väärtuste vahel kehtivad järgnevad seosed [27]:

$$P = \frac{3r}{2 + r} \quad r = \frac{2P}{3 - P} \quad (5,6).$$

Kuigi FP ja FA kirjeldavad sama fenomeni, eelistatakse FA-d, kuna see lihtsustab fluorestsentsipolarisatsiooni kirjeldavaid võrrandeid [23,27].

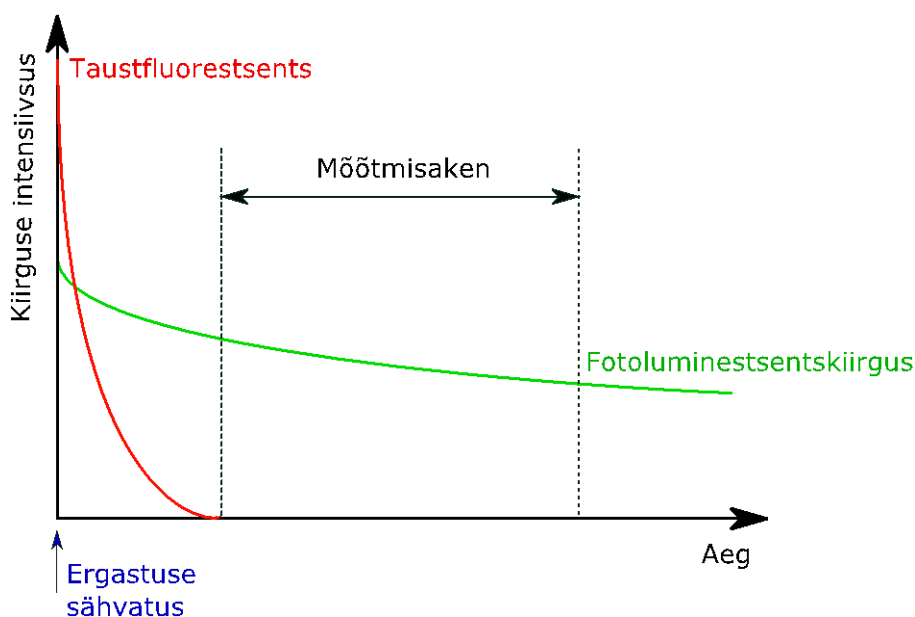


**Joonis 4.** Proovi kiiritatakse polariseeritud valgusega: vaba fluorestsentssond pöörleb lahuses kiirelt ning kiirgab depolariseeritud valgust. Valguga kompleksi moodustanud fluorestsentssond pöörleb aeglaselt ega jõua enne kiirgamist oluliselt oma asendit muuta, kiirates polariseeritud valgust [17].

Kuna FA nähtus annab meile ettekujutuse lahuses olevate molekulide suurusest, siis on FA mõõtmisel põhinevaid meetodeid võimalik kasutada biokeemiliste interaktsioonide uurimiseks. Valguga seondumisel väikese molekulmassiga fluorestsentssondi pöörlemine aeglustub ning FA väärtus tõuseb [27]. Fluorestsentsmärgisega väikese molekuli konkurentne väljatõrjumine valgu aktiivsaidist põhjustab lahuse FA väärtuse vähenemise, kuna väike fluorofoor pöörleb nüüd lahuses eraldi olles kiiremini ja kiirgab depolariseeritud valgust [23].

## 2.7 Aeglahutusega fotoluminestsents

Aeglahutusega fotoluminestsentsi meetod (*time gated luminescence* – TGL) on taustmüra vähendamiseks kasutatav fotoluminestsentsi määramise meetod, mis põhineb taustfluorestsentsi eluea ja fluorestsentssondi poolt kiiratud fotoluminestsentskiirguse eluigade erinevuses. Fluorofooride kiiratud luminestsentskiirguse eluiga on tavaliselt palju pikem kui lühikese elueaga taustfluorestsentsil. Fluorofoor ergastatakse valguspulsiga ning fotoluminestsentskiirguse mõõtmist alustatakse pärast lühikest viivitust (nt 50 mikrosekundit), mille jooksul enamus taustmürast jõuab kustuda (Joonis 5). Mõõtmisakna pikkus sõltub mõõdetava pika elueaga kiirguse elueast. Signaal-müra suhet vähendab veelgi mõõtmiste kordamine [17,28]. Hiljuti on avastatud uudseid tiofeeni või selenofeeni sisaldavad fluorestsensmärgistatud ARC-tüüpi inhibiitorid (ARC-Lum sondid), mida on võimalik TGL mõõtmistel kasutada [29]. PK-ga mittekomplekseerunud ARC-Lum sondid pika elueaga fotoluminestsentskiirgust ei emiteeri, mistõttu on neid võimalik kasutada kui pika elueaga kiirguse intensiivsuse mõõtmisel põhinevaid biosensoreid aktiivse kinaasi detekteerimiseks [29].

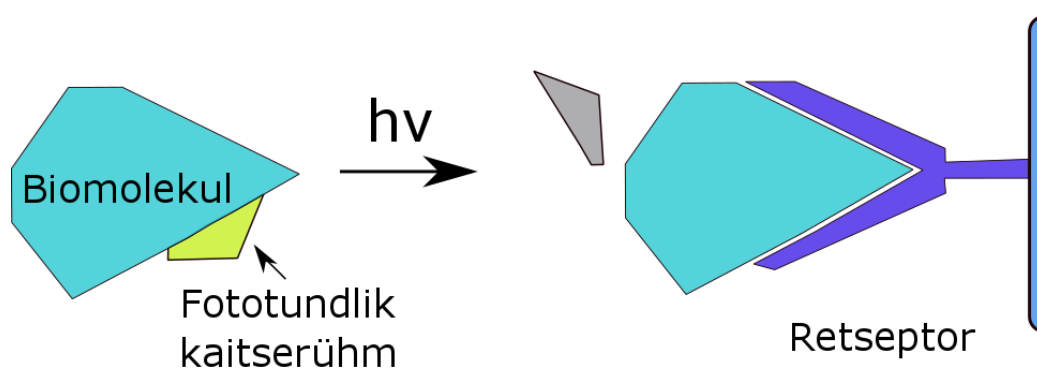


**Joonis 5.** Aeglahutusega pika elueaga fotoluminestsentskiirguse mõõtmise põhimõte [25].

## 2.8 Fotoreguleeritavad bioaktiivsusega ühendid

Fotoreguleeritav bioaktiivsusega ühend sisaldab fotoaktiveeritavat või -inaktiveeritavat rühma, mistõttu saab tema keemilist või bioloogilist aktiivsust valguse toimetel mõjutada [30]. Fotoaktiveeritava rühma sidumisel molekuli piirkonda, mis on biokeemiliseks aktiivsuseks oluline, nii et molekuli bioaktiivsus kaob, on võimalik UV-Vis valgusega kiiritades fototundlik rühm lagundada ning ühendi aktiivsus taastada (ingl k. *caged compounds*) (Joonis 6) [30,31].

Fototundlikke ühendeid on kasutatud keemias ja füsioloogias üle kolmkümne aasta, mille jooksul on fototundlike kaitserühmadega seotud paljusid biomolekule ja sekundaarseid virgatsaineid (nt kaltsiumioonid, neurotransmitterid, inositoolid, nukleotiidid, peptiidid, ensüümid, mRNA ja DNA) [31,32]. Valgus on hea regulatiivne vahend, kuna läbib raku membraani, on väga hea ruumilise ja ajalise lahutusega ning tema intensiivust saab lihtsalt reguleerida [32,33]. Fototundlike kaitserühmade abiga on võimalik juhtida erinevaid bioloogilisi protsesse [31]. Lisaks eelnevale on fototundlike kaitserühmi kasutatud sünteetilises keemias ja afiinsuskromatograafias, kus on kandja külge püütud biomolekul on võimalik fotolüüsiga selle küljest eraldada [34,35].



**Joonis 6.** Fototundliku kaitserühma eemaldamine fotolüüsil taastab biomolekuli aktiivsuse [31].

Ideaalne bioloogilistes eksperimentides kasutatav fototundlik kaitserühm peaks fotolüüsi käigus kiirelt ja kõrge saagisega lagunema, mitte oluliselt vähendama aine vees lahustumist, püsima pimedas stabiilsena, olema hea bioloogilise sobivusega ning lagunema kõrgemal lainepikkusel kui 300 nm [36]. Bioaktiivsele ühendile seotud fototundlik kaitserühm peaks tagama bioaktiivse ühendi inaktiivsuse ning olema enne fotolüüsi inertne [31]. Ka kaitserühma fotolagunemise produkt peaks olema piisavalt inertne, et vältida ebasoovivaid kõrvalreaktsioone [32].

Fototundlike ühendite fotokeemilised omadused muutuvad sõltuvalt fotolüüsi kiirusest ja efektiivsusest [32]. Fotolüüsi efektiivsus näitab fotoaktiivsete ühendite lagunemise

osakaalu kiiritamisel ning seda mõjutab neeldumiskoeffitsiendi ( $\epsilon$ ) (proovile langenud neelatud valguse proportsioon) ja kvantsaagise ( $\phi$ ) kombinatsioon ( $\epsilon \cdot \phi$ ). Mida kõrgem on fotolüüsi efektiivsus, seda lihtsam on fototundliku ühendi kasutamine. Madal fotolüüsi efektiivsus võib olla praktiliseks kasutuseks liiga aeglane, kuna mõjuda rakkudele tapvalt (UV-ga kiiritamise puhul) [31,32].

Fotolüüsi kvantsaagis ( $\phi$ ) näitab molekulide osakaalu, millest tekib pärast footoni neelamist fotoprodukt. Fotolüüsi kvantsaagis arvutatakse võrrandiga:

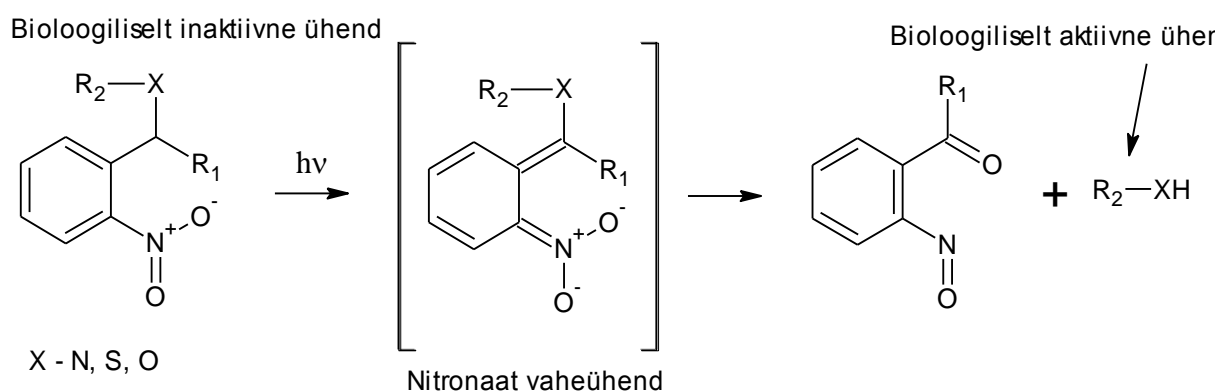
$$\phi_{\text{fotolüüs}} = \frac{\text{Fotolüüsil tekkinud molekulide arv}}{\text{Neelatud footonite arv}} \quad (7),$$

Fotolüüsi kiirus näitab fotoproduktide teket ajaühikus ning peaks bioloogilistes süsteemides olema kiirem kui uuritav protsess [32]. Bioaktiivse molekuli fotolagunemine võib toimuda mikrosekunditest sekunditeni [36].

UV kahjustab enamikke bioloogilisi molekule (eriti madalatel lainepikkustel ning hapniku juuresolekul). Tõsiseid probleeme võib tekkida juba lihtsates bioloogilistes katsetes, mis sisaldavad vaid ühte tüüpi valke (intermolekulaarsete ristsidemete teke, polüpeptiidsete ahelate katkemine, kahjustused aminohappe jääkidele nagu näiteks trüptofaan (Trp)) [32]. Enamike fototundlike ühendite lagundamiseks vajaliku UV kiirguse lainepikkus jääb vahemikku 250-400 nm. Minimaliseerimaks kahjustusi valkudele ja suurendamaks koest läbivust võiks kiiritamise lainepikkus olla soovitatavalt üle 300 nm. [36,18]

Fototundlike nähtuste (nt fotolüüs, fotosüntees) efektiivsuse sõltuvust lainepikkusest näitab aktsioonispekter [23].

Enimkasutatud fototundlik kaitserühm on 2-nitrobensüül (2-NB) ning selle derivaadid [33,36]. 2-NB tüüpi ühendite puudus on reaktiivse nitrosoketooni või nitrosoaldehüüdi teke, mis võib reageerida valkude nukleofiilsete rühmadega (Skeem 2). [32]



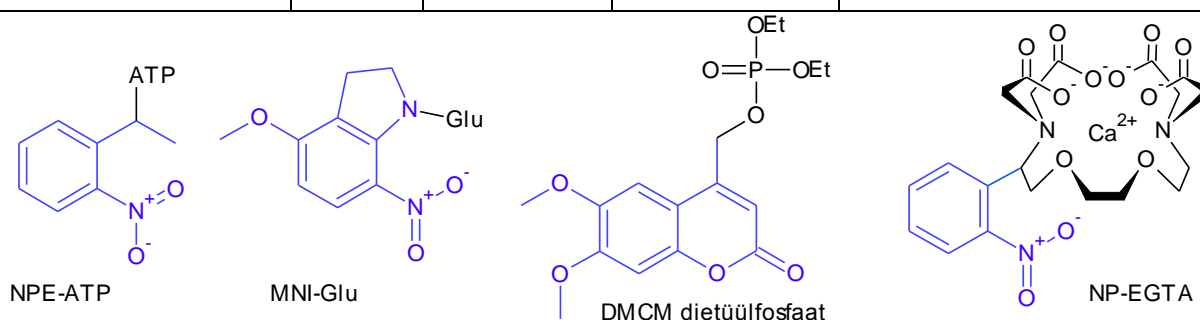
**Skeem 2.** Üldreaktsiooniskeem nitrobensüül fotoaktiivsete ühendite lagunemisest [37].

Näiteks nitroveratrüülrühmade puhul võivad solvendis sisalduvad amino- ja tiolrühmad mõjutada fotoreaktsiooni reageerides fotolüüsi vaheetappides tekkivate ühenditega (aluselises keskkonnas võib toimuda nukleofiilne asendus aromaatses tuumas). Soovimatuid kõrvalreaktsioone vähendab kergelt happeline keskkond ja püüduragentide lisamine reaktsioonisegusse. [38]

Lisaks 2-NB derivaatidele on uuritud palju erinevaid fototundlike kaitserühmi, mida saab kasutada vastavalt vajadusele erinevatel eesmärkidel (Tabel 1, Joonis 7). Tuntumad on ka näiteks fotoaktiivsed dimetoksükumariin-4-üülmetüül (DMACM) molekulide derivaadid, mille eelisteks on kõrge fotolüüsi saagis, hea püsivus pimedas ja kõrge neeldumiskoeffitsient pikemal lainepikkusel kui 350 nm. DMACM derivaatide esineb fluorestsentsomadusi, mis võivad erinevate biokatsete puhul segada (kiirgavad nt samadel lainepikkustel fluorestsentssondiga). Mittekattuvate neeldumisspektritega fototundlikud kaitserühmad võimaldavad ortogonaalset eemaldamist erinevatel lainepikkustel. [31,32]

**Tabel 1.** Näited erinevatest fototundlikest ühenditest, kus m.r. tähistab mitteraporteeritud andmeid [31,32,39].

Fotoreguatiivse aine lühend	$\Phi$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Fotolüüsi kiirus (s <sup>-1</sup> )
NPE-ATP	0,63	260	26 600	86 (pH 7,1)
MNI-Glu	0,085	m.r.	4300	2,7·10 <sup>3</sup> (pH 7,0)
DMCM	0,08	346	11 400	m.r.
NP-EGTA	0,23	m.r.	970	6,8·10 <sup>4</sup>



**Joonis 7.** Valik fotolagunevate rühmadega (tähistatud sinisega) seotud molekulidest, kus vasakult on esimene 1-(*orto*-nitrofenüül)-etüül ATP (NPE-ATP), teine 4-metoksü-7-nitroindolinüül glutamaat (MNI-Glu), kolmas (6,7-dimetoksükumariin-4-üül)metüül (DMCM) dietüülfosfaat ja neljas 2-nitrofenüül-etüleenglükooltetraäädikhape (NP-EGTA) [31,32,39].



### 3. Eksperimentaalne osa

#### 3.1 Aparatuur ja töövahendid

UV-Vis-spektreid mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Töös kasutatud ainete neeldumiskoeffitsiendid:  $\epsilon_{301\text{nm}}(\text{Fmoc}) = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{350\text{nm}}(\text{ANFA}) = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{260\text{nm}}(\text{ARC-902}) = 15\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\epsilon_{282\text{nm}}(\text{ARC-583 (5-TAMRA)}) = 80\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{652\text{nm}}(\text{ARC-1182 (PromoFluor)}) = 250\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{285\text{nm}}(\text{ARC-1411}) = 16\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{284\text{nm}}(\text{ARC-2100}) = 16\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{288\text{nm}}(\text{ARC-2103}) = 20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{287\text{nm}}(\text{ARC-2104}) = 16\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{350\text{nm}}(\text{ARC-2105}) = 5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Spektreid mõõdeti 1,5  $\mu\text{l}$  ruumalaga lahuses, mille optiliseks teepikkuseks oli 0,1 cm. Inhibiitorite kontsentratsioonide arvutamiseks kasutati Lambert-Beer'i seadust:

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)cl \quad (8),$$

kus  $A$  on neeldumine ja  $\epsilon$  on neelduvuskoeffitsient ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) lainepikkusel  $\lambda$ ,  $c$  on aine kontsentratsioon,  $l$  on optiline teepikkus. ARC-2103 neeldumiskoeffitsient arvutati deasapuriini ja fotovahelüli fragmentide neeldumiskoeffitsientide liitmisel 288 nm juures. Arvutus tehti eeldusel, et kumbki ARC-2103 struktuuris paiknev neelav fragment ei mõjuta teineteist.

FA ja TGL mõõtmised teostati mikrotiiterplaadilugejaga PHERAstar (BMG Labtech). Mõõdetavad lahused valmistati 384 süvikuga mikrotiiterplaatidele (Corning). Enne mõõtmist inkubeeriti lahuseid THERMOstar (BMG Labtech). Andmetöötluseks kasutati tarkvarasid GraphPad Prism (versioon 6) ja Microsoft Excel (versioon 2013).

Kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) analüüsiks ja puhastamiseks kasutati Shimadzu Prominence LC Solution HPLC kromatograafi SPD M20A diodrividetektoriga. Pöördfaaskromatograafia teostati kolonniga Luna C<sub>18</sub> (250×4,6 mm), osakese suurusega 5  $\mu\text{m}$ . Elueerimiseks kasutati ACN/H<sub>2</sub>O gradienti (0,1 % TFA), mille voolutuskiirus oli 1 ml/min. Massispektreid mõõdeti mass-spektromeetriga Shimadzu LCMS-2020. Vedelikkromatograafiat aitas teostada Gerda Raidaru (Tartu Ülikool).

Abimaatriksiga laser-desorptsioon-ionisatsioon (MALDI) massispektrid mõõdeti lennuaja MALDI (MALDI-TOF) massispektromeetriga Voyager DE-Pro (Applied Biosystems), abimaatriksina kasutati dihidroksübensoehapet (DHB).

Tuumamagnetresonantsspektrid (TMR) mõõdeti spektromeetriga Bruker Avance III HD. <sup>1</sup>H TMR mõõdeti sagedusel 700 MHz ning <sup>13</sup>C TMR spektrid mõõdeti sagedusel 176

MHz. Sisestandardina kasutati tetrametüülsilaani (TMS). Mõõtmisi teostas Kaido Viht (Tartu Ülikool).

### **3.2 Kasutatud kemikaalid**

Töös kasutati kemikaale: Fmoc-[D-Arg(Pbf)]<sub>6</sub>-[D-Lys(Boc)]-amiidresin, Fmoc-[D-Arg(Pbf)]<sub>6</sub>-[D-Lys(Boc)]NH<sub>2</sub>-resin (Caslo); HOBt (Bachem); piperidiin (Alfa Aesar); n-BuOH, Nda (Reachim); NEt<sub>3</sub> (Merck); 6-kloro-7-deasapuriin (Pharnorcia); TFA (Fisher); Na<sub>0,5</sub>HEPES (Santa Cruz); NaCl (Riedel-de Haën); DCE, piperasiin (Fluka); Fmoc-rink-amiid-MBHA resin, DMF, HBTU, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Ahx ja 4-{4-[1-(9-Fmoc)etüül]-2-metoksü-5-nitrofenoksü}butaanhape (IRIS Biotech); püridiin, NMM, TIPS, dietüüleeter, DMSO, äädikhape anhüdriid, iPrOH, NaCl, Tween®20, DTT ja BSA (Sigma-Aldrich); MQ H<sub>2</sub>O (eritakistus 18,2 MΩ·cm; summaarne süsiniku sisaldus < 6 mg/kg; aparaat: Millipore Simplicity 185).

Töös kasutati puhverlahuseid:

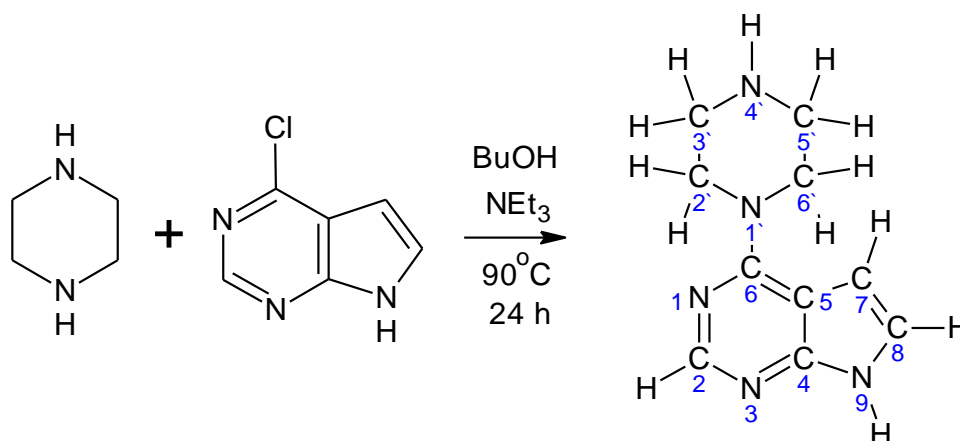
Puhver A – 50 mM HEPES (pH = 7,5); 150 mM NaCl; 0,005 % (vol) Tween®20; 5 mM DTT; 75 µM BSA (0,5 mg/ml);

Puhver B – 50 mM HEPES (pH = 7,5); 150 mM NaCl; 0,005 % (vol) P20; 5 mM DTT.

Inimese PKAc tüüp α täisjärjestus toodetud Jevgenia Rogozina (Tartu Ülikool) poolt; rekombinantne veise PKAc tüüp α täisjärjestus oli Dr Dirk Bossemeyeri (Saksamaa Vähiuuringute Keskus, Heidelberg, Saksamaa) uurimisrühma kingitus.

ARC-902, ARC-1411, ARC-1182, ARC-583 olid eelnevalt laboris sünteesitud (struktuurid lisas 1).

### 3.3 6-(piperasiin-1-üül)-7-deasapuriini süntees



**Skeem 3.** PIPY sünteesiskeem.

6-(piperasiin-1-üül)-7-deasapuriini (PIPY) süntees (Skeem 3) teostati 25 ml ümarkolvis. Butanoolis (6,5 ml) lahustatud 6-kloro-7-deasapuriinile (100,76 mg, 0,66 mmol, 1 eq) lisati piperasiin (225,42 mg, 2,62 mmol, 4 eq) ja trietüülamiin (455 µl, 3,27 mmol, 5 eq). Reaktsiooni segu kuumutati 90 °C juures 24 tundi. Reaktsiooni jälgiti planaarkromatograafiliselt (kloroform:MeOH, 10:1, v:v; 6-kloro-7-deasapuriini  $R_f = 0,8$ ; saadus  $R_f = 0,0$ ). Sadenenud saadus pesti väikese koguse n-BuOH-ga, filtreeriti ja vakumeeriti. Produkti analüüsiti kasutades TMR-i (Lisa 2). Reaktsiooni saagis määrati kaalutise järgi (30 %).

<sup>1</sup>H TMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 700 MHz) δ 11,82 (s, 1H, NH); 8,20 (s, 1H, H-2); 7,25 (dd, J = 2.1 Hz, 3.5 Hz, 1H, H-8 või H-7); 6,65 (dd, J = 1.4 Hz, 3.5 Hz, 1H, H-7 või H-8); 4,00 (m, 4H, H-3', H-5'), 3,12 (m, 4H, H-2', H-6'). <sup>13</sup>C TMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 176 MHz) δ 156.0, 151.9, 150.3, 121.9, 102.3, 100.5, 43.2, 43.0.

### 3.4 Peptiidisüntees tahkel faasil

Peptiidifragmentide sünteesiks kasutati Fmoc-tahkefaasi sünteesistrateegiat (Joonis 9). Põhisolvendiks kasutati DMF-i, mille ruumala oli ligikaudu 1 ml 100 mg vaigu kohta. Kõik tahkefaasi sünteesietapid teostati toatemperatuuril. Vajalik vaigu kogus kaaluti PP filtriga (70 µm poori suurus) varustatud süstlasse ning lasti 45 minutit DMF lahuses punduda. Fmoc-kaitserühm eemaldati kahekordse töötlusega 20 % piperidiini lahusega DMF-is (5 + 15 min) (Skeem 4). Vaigu funktsionaalrühmade hulk massiühiku kohta (*loading*, mmol/g) määrati spektrofotomeetriliselt dibensofulveeni neeldumise järgi 301 nm juures ( $\epsilon = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Iga liidetava fragmendi (3 eq) karboksüülrühma eelaktiveerimiseks kasutati HOBt (3 eq),

HBTU (2,95 eq) ja NMM (9 eq) segu, mis lisati kolm minutit pärast kokkusegamist vaigule (Skeem 5). Atsüülimise reaktsioonid teostati reaktsioonisegusid tund aega loksutades. Pärast igat sünteesietappi pesti vaik viis korda DMF-iga läbi. Reaktsiooni õnnestumist jälgiti Kaiseri testi, milleks paar vaigutera eemaldati reaktsioonisegust ning neile lisati eelnevalt valmistatud 5 % ninhüdriini ja 80 % fenooli lahused etanoolis (mõlemat 20 µl). Segu soojendati 105 °C juures 5 minuti jooksul ja vabade aminorühmade korral värvus lahus siniseks.

Nda (nonaandihappe) ja PIPY struktuuri viimiseks aktiveeriti esmalt Nda (10 eq) HOBt-i (3 eq), HBTU (3 eq) ja NMM-i (20 eq) seguga DMF-is, lisati reaktsioonisegule ning lasti tund aega reageerida. Vaik pesti viis korda DMF-iga läbi. Vaigule liitunud Nda teine karboksüülrühm aktiveeriti kolme minuti jooksul HOBt-i (3 eq), HBTU (3 eq) ja NMM-i (20 eq) seguga, reagentid eemaldati pestes vaiku DMF-iga. Viimaks lisati reaktsioonisegule PIPY (2,5 eq) ning reaktsioonisegu jäeti loksutile 24 h.

Enne sünteesitud peptiidi vaigu küljest mahavõtmist pesti vaiku isopropanooliga (2 korda) ja dikloroetaaniga (3 korda) ning seejärel kuivatati vaakumis 15 minutit. Peptiidi mahavõtmiseks lisati süstlasse TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (90/5/5 v/v/v) segu ning pärast kolme tundi koguti lahusefaas eraldi kolbi, solvendid eemaldati vaakumis ja segu tritueeriti eetriga. Saadused puhastati HPLC-ga ja molekulmassid määrati ESI-MS-ga.

**ARC-2100:** PIPY–Nda–DAla–Ahx–DArg<sub>6</sub>–Lys–NH<sub>2</sub>;  $\lambda_{\text{max}} = 283 \text{ nm}$ ;  $M(\text{C}_{70}\text{H}_{128}\text{N}_{34}\text{O}_{11}) = 1622,0 \text{ Da}$  (arvutatud), HPLC  $t_r = 7,2 \text{ min}$  (ACN gradiendi kiirus 10 %-80 %; 30 min jooksul) Preparatiivne saagis üle 10 etapi – 2 %. MALDI-TOF-iga saadud massid on lisas 3. Puhastatud ARC-2100 HPLC kromatogramm, MS ja UV spektrid on toodud lisas 4.

**ARC-2103:** PIPY–Nda–ANFA–DArg<sub>6</sub>–Lys–NH<sub>2</sub>;  $\lambda_{\text{max}} = 288 \text{ nm}$ ;  $M(\text{C}_{74}\text{H}_{128}\text{N}_{34}\text{O}_{14}) = 1718,0 \text{ Da}$  (arvutatud),  $t_r = 8,9 \text{ min}$  (ACN gradiendi kiirus 15 %-60 %; 30 min jooksul) Preparatiivne saagis üle 6 etapi – 1,5 %. Puhastatud ARC-2103 HPLC kromatogramm, MS ja UV spektrid on toodud lisas 5.

**ARC-2104:** PIPY–Nda–NH<sub>2</sub>;  $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$ ;  $M(\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2) = 372,5 \text{ Da}$  (arvutatud),  $t_r = 12,4 \text{ min}$  (ACN gradiendi kiirus 10 %-60 %; 30 min jooksul). Preparatiivne saagis üle 4 etapi – 2,66 %. Puhastatud ARC-2100 HPLC kromatogramm, MS ja UV spektrid on toodud lisas 6.

**ARC-2105:** Ac–ANFA–DArg<sub>6</sub>–Lys–NH<sub>2</sub>;  $\lambda_{\text{max}} = 247 \text{ nm}, 350 \text{ nm}$ ;  $M(\text{C}_{58}\text{H}_{107}\text{N}_{29}\text{O}_{13}) = 1404,6 \text{ Da}$  (arvutatud),  $t_r = 12,7 \text{ min}$  (ACN gradiendi kiirus 15 %-60 %; 20 min jooksul) Preparatiivne saagis üle 5 etapi – 2,66 %. Puhastatud ARC-2105 HPLC kromatogramm, MS ja UV spektrid on toodud lisas 7.

### 3.5 Aktiivse PKAc kontsentratsiooni määramine

Enne inhibiitorite väljatõrjumiskatseid määrati aktiivse PKAc kontsentratsioon. Selleks valmistati PKAc kahekordsete lahjenduste seeria (alates summaarsest PKA valgu kontsentratsioonist 200 või 400 nM), millele lisati fluorestsentssond ARC-1182 (lõppkontsentratsiooniga 10 nM;  $K_D = 0,02$  nM [40]). Lahjenduste valmistamiseks kasutati puhver A-d ning lahuste lõppruumala oli 20 µl. Lahused valmistati 384 süvendiga mikrotiiterplaatidele. Enne mõõtmist inkubeeriti lahuseid 30 min 30 °C juures. Lahuste TGL signaalide väärtuseid mõõdeti 30 °C juures optilise mooduliga [EX 337(50), EM 675(50)]. Mõõtmisakna vahemikuks valiti 50–400 µs ning signaal koguti 200-st ergastus/emisioonitsüklist. Igat lahust mõõdeti kolm korda ja tulemustest arvutati keskmine. Aktiivse PKAc kontsentratsioon arvutati võrrandiga:

$$Y = Y_{min} + M \cdot \frac{(L_f + K_D + k \cdot X - \sqrt{(L_f + K_D + k \cdot X)^2 - 4 \cdot L_f \cdot k \cdot X})}{2} \quad (9),$$

kus  $Y$  – mõõdetud TGL signaali intensiivsus,  $Y_{min}$  – taustasignaal,  $M$  – kompleksi molaarne TGL signaali intensiivsus,  $L_f$  – fluorestsentssondi summaarne kontsentratsioon,  $K_D$  – kompleksi dissotsiatsioonikonstant,  $X$  – ensüümivalgu summaarne kontsentratsioon,  $k$  – aktiivne/nominaalne ensüümi kontsentratsioon.

### 3.6 cAMP-sõltuval proteiinkinaasile seondumise iseloomustamine

ARC inhibiitorite iseloomustamiseks ( $IC_{50}$  ja  $K_D$  väärtuste leidmiseks) kasutati kahte erinevat süsteemi – TGL meetodit ja FA meetodit. Kõikide lahjenduste valmistamiseks kasutati puhver A-d ning lahuste lõpp ruumala oli 20 µl.

TGL meetodi puhul valmistati uuritavast inhibiitorist lahjendusseeria (algkontsentratsiooniga 7,5–10 µM), millele lisati kompleks aktiivsest PKAc-st ja fluorestsentssondist ARC-1182, lõppkontsentratsioonidega vastavalt 1 nM ja 10 nM. Mikrotiiterplaate inkubeeriti 30 min 30 °C juures. TGL mõõtmisteks kasutati optilist moodulit [EX 377(50), EM 675(50)]. Mõõtmisakna vahemikuks valiti 50–400 µs ning summeeriti 200 ergastus/emisioonitsükli, igat lahust mõõdeti kolm korda ja võeti tulemuste aritmeetiline keskmine.

FA meetodi puhul valmistati uuritavast inhibiitorist lahjendusseeria (algkontsentratsiooniga 8–24 µM), millele lisati kompleks aktiivsest PKAc-st lõppkontsentratsiooniga 3 nM ja fluorestsentssondist ARC-583 lõppkontsentratsiooniga 2 nM. Mikrotiiterplaate inkubeeriti 15 min 30 °C juures. FA mõõtmisteks kasutati optilist moodulit

[EX 540(50), EM 590(50)]. Detektori kalibreerimiseks kasutati vaba fluorestsentssondi lahust.

$IC_{50}$  väärtused arvutati võrrandi järgi:

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - X) \cdot H}} \quad (10),$$

kus  $Y$  – mõõdetud TGL/FA signaali intensiivsus,  $Y_{min}$  – minimaalne TGL/FA intensiivsuse väärtus,  $Y_{max}$  – maksimaalne TGL/FA intensiivsuse väärtus,  $IC_{50}$  – kontsentratsioon, mille juures toimub pool maksimaalsest väljatõrjumisest,  $X$  – inhibiitori kontsentratsiooni logaritm,  $H$  – graafiku tõusu faktor (*Hillslope*).

$K_D$  väärtused arvutati TGL mõõtmiste korral võrrandist:

$$Y = Y_{min} + M \cdot [EL_f] \quad (11),$$

kus  $Y$  – mõõdetud TGL signaali intensiivsus,  $Y_{min}$  – taustsignaal,  $M$  – ensüümi ja fluorestsentssondi vahelise kompleksi molaarne luminescentsi kiirguse intensiivsus,  $[EL_f]$  – ensüümi ja fluorestsentssondi vahelise kompleksi tasakaaluline kontsentratsioon, mis arvutati võrrandist:

$$[EL_f] = \frac{L_f \cdot \{2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\Theta}{3}\right) - a\}}{3 \cdot KD_1 + \{2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\Theta}{3}\right) - a\}} \quad (12),$$

$$a = KD_1 + KD_2 + 10^X + L_f - E$$

$$b = KD_1(10^X - E) + KD_2(L_f - E) + KD_1 \cdot KD_2$$

$$c = -KD_1 \cdot KD_2 \cdot E$$

$$\Theta = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

kus  $L_f$  – fluorestsentssondi summaarne kontsentratsioon,  $K_{D1}$  – ensüümi ja fluorestsentssondi vaheline dissotsiatsiooni konstant,  $K_{D2}$  – ensüümi ja inhibiitori vaheline dissotsiatsiooni konstant,  $X$  – konkureeriva inhibiitori summaarne kontsentratsioon logaritm,  $E$  – aktiivse ensüümi kontsentratsioon.

$K_D$  väärtused arvutati FA mõõtmiste korral võrrandist:

$$Y = (1 - M) \cdot A_f + M \cdot A_b, \quad (13)$$

$$M = \frac{Q \cdot [EL_f]}{1 + [EL_f] \cdot (Q - 1)} \quad (14),$$

kus  $Y$  – mõõdetud FA signaali intensiivsus,  $Q$  – seotud ja vaba fluorestsentssondi fluorestsentsi intensiivsuste jagatis,  $A_f$  – vaba sondi anisotroopia,  $A_b$  – täielikult

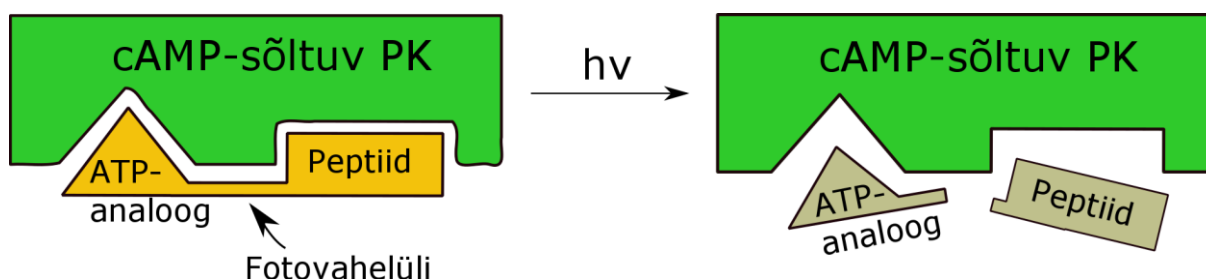
kompleksseerunud sondi anisotroopia,  $[EL_f]$  – ensüümi ja fluorestsentssondi vahelise kompleksi tasakaaluline kontsentratsioon (arvutatakse võrrandist 12).

### **3.7 Kiiritamise katsed**

ARC proove (30  $\mu$ l) kiiritati lahtistes mikrotuubides jäävannis (distantliga 30 cm valgusallikast) UV Hg-W lambiga 300 W (Ultra-Vitalux OSRAM), mis kiirgab UV-d lainepikkustel 280-400 nm. Mikrotuube kiiritati jäävannis, et vältida proovide soojenemist ja aurustumist. Kiiritamise katseteks valiti selline inhibiitori kontsentratsioon, mida oleks võimalik otse bioloogilistes katsetes kasutada (30  $\mu$ l, 10  $\mu$ M). Proove kiiritati pool tundi kuni viis tundi. Katsed viidi läbi kahes paralleelis, varieerides tuubide asukohti lambi all, et vältida võimalikku kiirguse ruumilise ebaühtluse mõju katsetulemustele. UV lamp soojenes enne proovide kiiritamist pool tundi ühtlase töörežiimi saavutamiseks. Kiiritamised viidi läbi samas puhvril nagu bioloogilised katsed (puhver A). HPLC-MS analüüsiks kiiritati proove ARC-2103 ja ARC-2015 (10  $\mu$ M, 1 ml, kiiritusaeg 1 h) kvartsküvettides puhvril B.

## 4. Tulemused ja arutelu

Kuna ARC-ide kõrge seostumisvõime ensüümile tuleneb adenosiini analoogi ja arginiinirikka peptiidi omavahelisest sidumisest molekulaarse vahelüliga, siis nende molekulifragmentide ühendamine fototundliku vahelüli kaudu võib anda tulemuseks fotolagundatava PK bisubstraatses inhibiitori, mille afiinsus lagunemise toimel, väheneb (Joonis 8).



**Joonis 8.** Fototundliku vahelüli lagunemine UV kiirguse toimel vähendab inhibiitori seondumisvõimet cAMP-sõltuva proteiinkinaasi suhtes.

Fotolagunemise mõju ühendi seondumisvõimele on seda suurem, mida vähem fotovahelüli struktuuri lisamine ühendi seostumisvõimet alandab ning mida väiksema sidumisvõimega on tekkivad fragmendid PK suhtes. Käesolevas töös valiti fototundlikuks vahelüliks 4-[4-(1-aminoetüül)-2-metoksü-5-nitrofenoksü]butaanhape (ANFA), kuna see pole steeriliselt liiga mahukas, kiiritamiseks vajalik lainepikkus jääb üle 300 nm ja see ühend on kommertsiaalselt kättesaadav. Töös kasutatud ANFA-l on üks kiraalne tsenter ning ostetud aine oli ratsemaat.

ATP-taskusse seonduvaks fragmendiks valiti PKAc suhtes varasemalt väga head seostumisvõimet demonstreerinud fragmendi PIPY, millega seotud ühenditel on mõõdetud pikomolaarseid  $K_D$  väärtusi [21]. Peptiidse osana kasutati ARC-idele omast heksaarginiini, mis on levinud struktuurielement basofiilsete kinaaside ARC-tüüpi inhibiitorites. Töö juhtühendiks oli varasemalt kirjeldatud erakordselt kõrge sidumisvõimega bisubstraatses inhibiitor ARC-1411, mille struktuur sisaldab samuti ATP-taskusse seonduva fragmendina PIPY-t ja peptiidse osana heksaarginiini (Joonis 2A) ( $K_D = 2$  pM PKAc suhtes) [21].

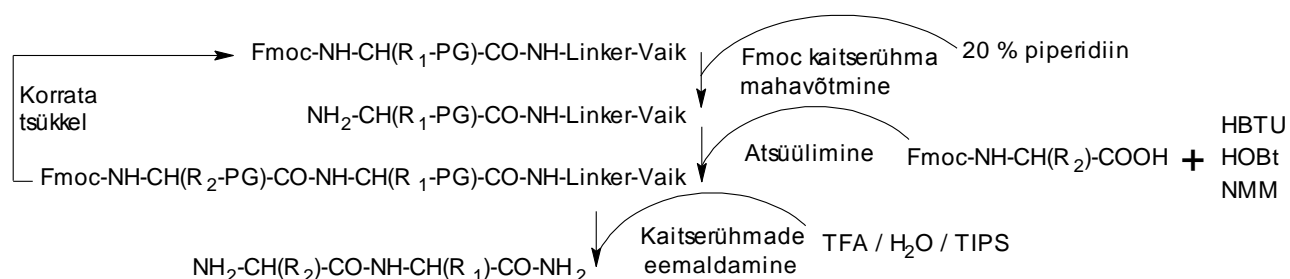
Eeltoodust lähtuvalt disainiti fotolagunev inhibiitor ARC-2103 (Joonis 16), mille struktuuris seoti PIPY ja heksaarginiini fragmendid üle Nda-ANFA fototundlikku vahelüli.

Varem on täheldatud, et vahelülisse kiraalse aminohappe lisamine võib ühendi seondumisvõimet üle 50 korra parandada. Näiteks adenosiini-oligoarginiini konjugaatide korral on vahelüli pikendamine ja DAla lisamine vahelülisse alandanud  $K_D$  väärtusi 0,3  $\mu$ M pealt 6 nM juurde [41]. Võrdlusainena sünteesiti ARC-2100 (Joonis 16), mille struktuuri vahelüli pikendati juhtühendiga ARC-1411 võrreldes kiraalse aminohappe (DAla) ja Ahx

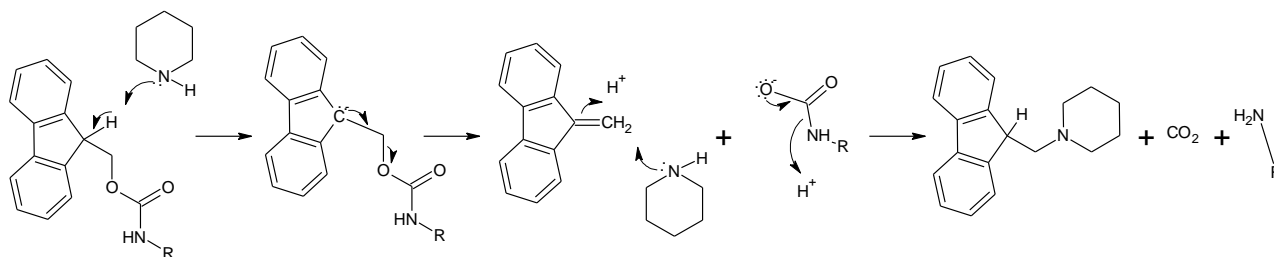


võrra, seega on see struktuur ARC-2103 mittefotolagunev analoog. Lisaks sünteesiti ühendid ARC-2104 ning ARC-2105, mis esindavad, ARC-2105 korral peale kiiritamist, ARC-2103 fotolagunemisel tekkivaid saaduseid.

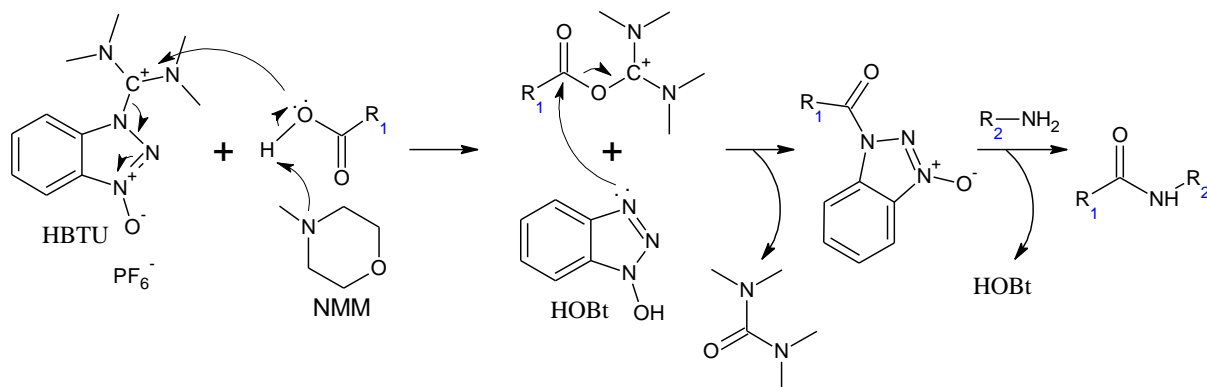
Töös kasutati ühendite sünteesiks Fmoc-peptidisünteesistrateegiat (Joonis 9). See on ortogonaalsete kaitserühmade strateegia, kus aminohappe  $\alpha$ -aminorühma kaitsmiseks kasutatav Fmoc-rühm on eemaldatav alusega (Skeem 4) ning kõrvalrühmade kaitserühmad ja peptiidi eemaldamine vaigult toimub happe toimel. Aminohappe peptiidile liitmiseks kasutati HBTU/HOBt-aktivatsiooni (skeem 5). Fmoc-peptidisünteesi strateegia eeliseks on võimalus Fmoc-eemaldamisel tekkivat dibensofulveeni spektroskoopiliselt kvantifitseerida, mis annab võimaluse sünteesietappide monitoorimiseks (skeem 4). Peptiidi vaigult eemaldamine toimus happelistes tingimustes ning kaitserühmadest tekkivate reaktsioonivõimeliste karbokatioonide neutraliseerimiseks kasutati püdüurreagendina TIPS-i. Peptiidid sünteesiti Rink-amiid MBHA-vaigul, mis võimaldab sünteesida C-terminaalselt amideeritud peptiide.



**Joonis 9.** Töös kasutatud üldine tahkefaasisünteesi skeem (PG tähistab kaitserühma) [42].

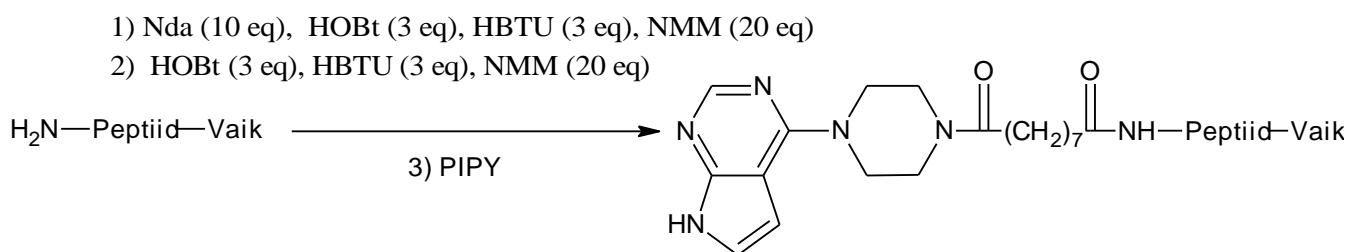


**Skeem 4.** Fmoc kaitserühma eemaldamise reaktsiooniskeem [42].



**Skeem 5.** Liidetava fragmendi struktuurile lisamine kasutades segu aktiveerimiseks HBTU, HOBT ja NMM segu [42].

Sünteesiti ARC-2100 (Joonis 16). Pärast Ahx lisamise etappi läbiviidud Kaiseri testi, märgati, et lahuses on vabasid amino-rühmi, ning konkreetset sünteesi etappi korrati. Ülejäänud sünteesiprotsess kulges ootuspäraselt. PIPY süntees (Skeem 3) ning struktuuri viimine (Skeem 6) viidi läbi varem avaldatud eeskirja järgi [21]. Esmalt atsüülitati põhiühendile kaitserühmadeta dihape, mille vabaks jäänud karboksüülrühm seejärel aktiveeriti. Seejärel lisati piperasiiniga deasapuriini ühend PIPY. Süntees kulges ootuspäraselt ning ühend saadi kätte piisava saagisega selle bioloogilise aktiivsuse mõõtmiseks. HPLC-MS analüüsis ilmnes lisaks oodatud saadusele ka kõrvalsaadus, mille mass oli Ahx massi võrra suurem. Kõrvalsaadus oli HPLC-s põhisaadusest hästi lahutatav (Lisa 8).

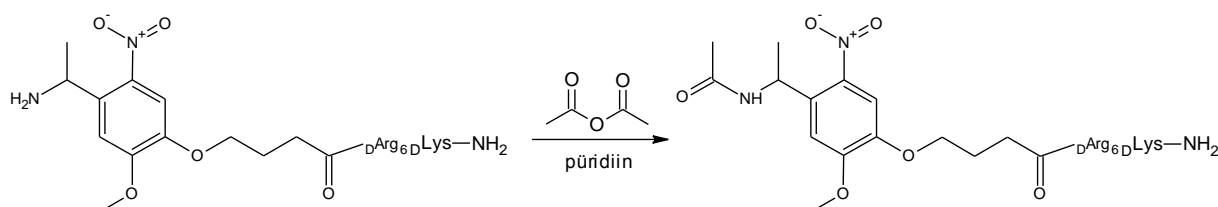


**Skeem 6.** PIPY ja Nda struktuuri viimise reaktsiooniskeem.

Sünteesiti fotovahelüluga ühend ARC-2103 (Joonis 16), mis sisaldas fototundliku ANFA rühma. Sünteesi protsess kulges ootuspäraselt. HPLC analüüsil ilmnes lisaks saaduse piigile ka suur kõrvalsaaduse piik, mille mass oli PIPY võrra madalam. PIPY puudumine ARC-2103 kõrvalsaaduse struktuurist ilmes ka UV spektrist (Lisa 9). Sellest võib järeldada, et PIPY fragment ei olnud täies ulatuses põhiühendile liitunud. ANFA fotovahelüluga ühendite stereoisomeerid HPLC-s ei lahutunud ning ained saadi puhastamisel kätte stereoisomeeride seguna.

Sünteesiti ARC-2104 (Joonis 16), mis jälgendab kiiritatud ARC-2103 lagusaadust ARC-2104 süntees kulges ootuspäraselt. Olulised kõrvalsaadused puudusid (Lisa 10).

Sünteesiti ARC-2105 (Joonis 16), mis erineb ARC-2103 struktuurist selle poolest, et ATP-taskusse seonduva PIPY fragmendi asemel on atsetüülrühm. Süntees kulges sarnaselt ARC-2103 sünteesile, kuid Nda ja PIPY struktuuri viimise asemel atsetüüliti N-terminali äädikhappe anhüdriidiga (Skeem 7). Süntees kulges ootuspäraselt. Esines ka kõrvalsaaduse piik (Lisa 11).

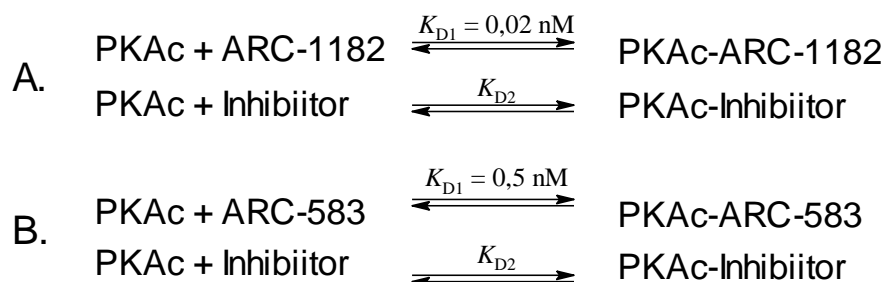


**Skeem 7.** Atsetüülimise reaktsiooni skeem.

Sünteeside madalad saagised võivad tuleneda PIPY kehvast reaktsioonivõimest Nda-ga ja PIPY halvas DMF-is lahustumisest. Sünteesi optimeerimiseks võiks eelnevalt PIPY ja Nda fragmendid omavahel liita ning alles seejärel ülejäänud molekuli struktuuri viia. Hoolimata saadud ainete madalatest saagistest õnnestus kõik struktuurid sünteesida koguses, mis on küllaldased nende bioloogilise aktiivsuse iseloomustamiseks.

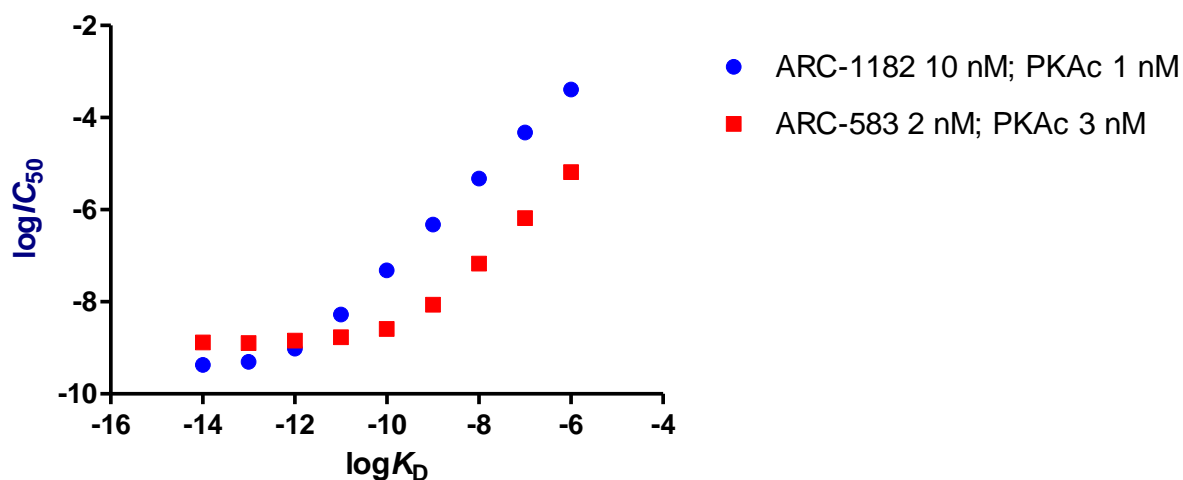
## 4.1 Bioloogilised katsed

Töös läbiviidud mõõtmised põhinesid konkureerival sidumisel tasakaalulises süsteemis, kus uuritav ühend ja fluorestsentssond konkureerivad sama PKAc sidumiskoha pärast. Mõõtmisel kasutati kahte süsteemi. Esimest tüüpi mõõtmised viidi läbi tingimustes, kus fluorestsentssondi (ARC-1182) ja aktiivse PKAc lõppkontsentratsioonideks oli vastavalt 10 nM ja 1 nM (ARC-1182-PKAc kompleksi  $K_D = 0,02$  nM) (Joonis 10A). Teist tüüpi mõõtmised viidi läbi tingimustes, kus fluorestsentssondi (ARC-583,  $K_D = 0,5$  nM) lõppkontsentratsiooniks oli 2 nM ja aktiivse PKAc omaks 3 nM (Joonis 10B). Sellist kahe tasakaalulise konkurentse sidumise süsteemi kirjeldab täpselt kuupvõrrand (võrrand 12), mille matemaatilise lahenduse pakkus välja Zhi-Xin Wang [43].



**Joonis 10.** Bioloogilistel katsetel kasutatud tasakaalulised süsteemid.

ARC-1182 väljatõrjumise katsete korral mõõdeti TGL signaali, mis tuleneb ARC-1182 struktuuris paiknevast tiofeenist. Kuna ARC-583 struktuurist puudub pika elueaga luminescentskiirgust põhjustav väävli või seleeni heterotsükkel, siis mõõdeti ARC-583 väljatõrjumise katsete korral FA signaali. Mõlema mõõtesüsteemi lineaarse piirkonna leidmiseks simuleeriti kõverad (Lisa 15), milleks kasutati võrrandeid 11 ja 13. Koostati graafik  $IC_{50}$  ja  $K_D$  väärtustest sõltuvusest (Joonis 11), millelt on näha, et kõrgema sidumisvõimega ARC-1182 fluorestsentssondiga mõõtmise lineaarne ala on pikem kui madalama sidumisvõimega ARC-582 korral.



**Joonis 11.** Simuleeritud konkureeriva ligandi  $IC_{50}$  väärtuste sõltuvus nende  $K_D$  väärtustest esitatud mõõtesüsteemides olenevalt fluorestsentssondi ja PKAc kontsentratsioonidest.

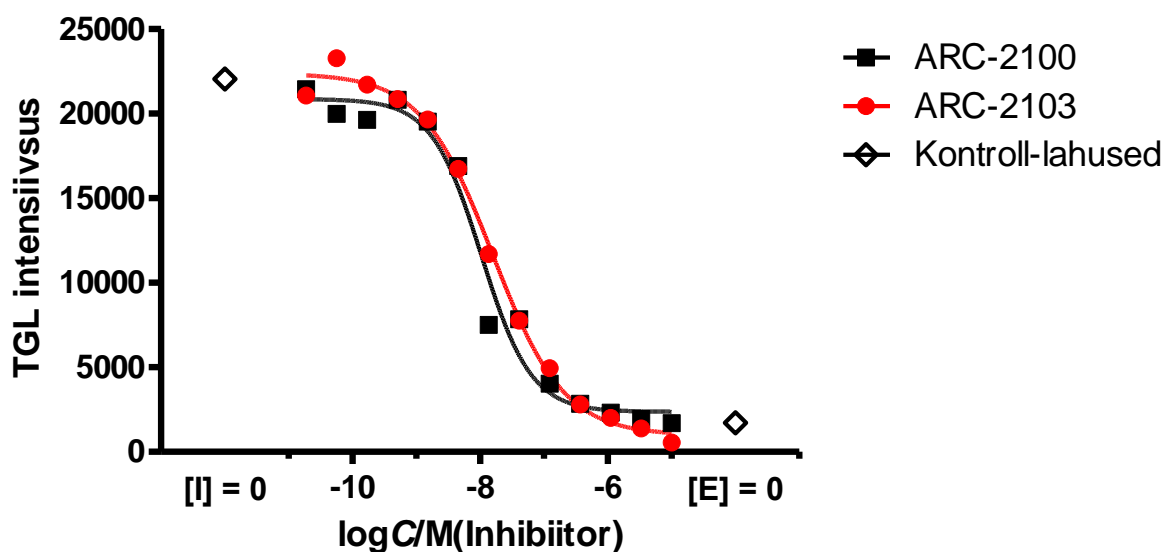
ARC-1182 süsteemiga mõõdetud  $IC_{50}$  väärtused on süstemaatiliselt kõrgemad, kui ARC-583 süsteemiga mõõdetud  $IC_{50}$  väärtused. Sellest võib järeldada, et ARC-1182 mõõtesüsteemiga saab mõõta kõrgema sidumisvõimega (madalama  $K_D$ -väärtusega) konkureerivaid ligande (inhibiitoreid) ning ARC-583 mõõtesüsteemiga paremini madala sidumisvõimega (kõrgema  $K_D$ -väärtusega) konkureerivaid ligande.

TGL mõõtmiste puhul kasutati suurt fluorestsentssondi ülehulka, tänu millele saadi intensiivset emissiooni signaali ning mõõtmispiirkond nihkus madalamate  $K_D$  väärtustega konkureerivate ligandide poole. FA mõõtmistel lisati mõõtesüsteemi ülehulgas ensüümi, et fluorestsentssond oleks piisavalt suures ulatuses seotud kinaasiga – vastasel juhul muudaksid lahuses vabana paiknevad sondid FA väärtuse madalaks ning fluorestsentsligandi kinaasiga sidumist ei oleks võimalik jälgida.

Täpne aktiivse kinaasi kontsentratsiooni määramine enne katseid on oluline, kuna kinaasi aktiivsus pole pika aja jooksul püsiv. Aktiivse PKAc kontsentratsioon määrati

sidumiskatsega, kus fluorestsentssondina kasutati ARC-1182. Üldiselt määrati kinaasi aktiivsuseks 50–60 %.

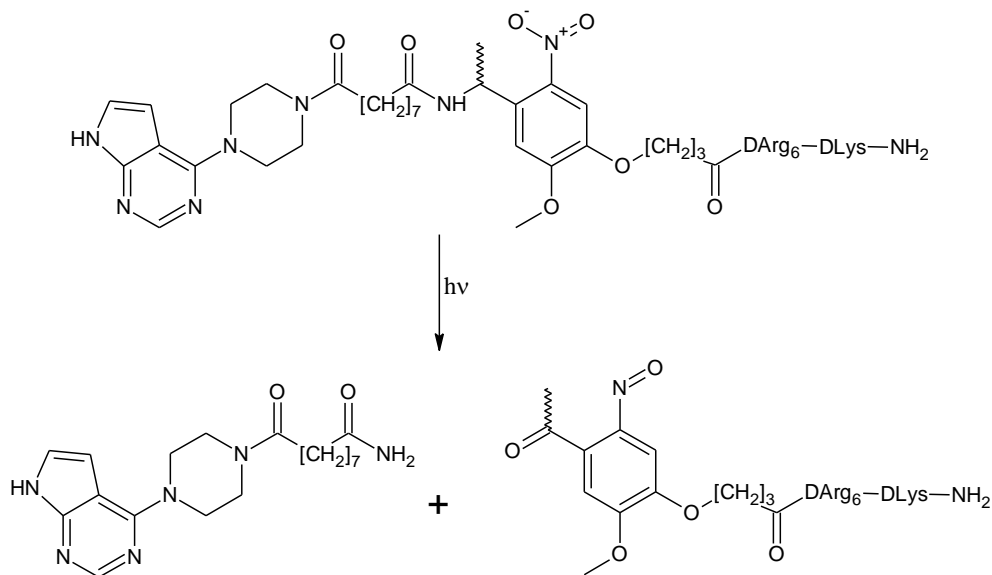
Vahelüli pikendamine ja kiraalse aminohappe lisamine struktuuri ei muutnud eriti ARC-2100 ( $K_D = 34 \pm 30$  pM) ühendi sidumisvõimet võrreldes ARC-1411-ga ( $K_D = 15 \pm 14$  pM) (lisa 14). Ka pärast fotovahelüli struktuuri liitmist säilitas ARC-2103 kõrge seondumisvõime ( $K_D = 39 \pm 21$  pM), mis näitab, et seda tüüpi struktuuris on võimalik kasutada paindliku alküülahela asemel ka jäigema struktuuriga aromaatsed tuumi sisaldavaid vahelülisid (Joonis 12).



**Joonis 12.** TGL mõõtmiste tulemused võrdluses ARC-2100 ja ARC-2103. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 sondi lõppkontsentratsioon oli 10 nM.

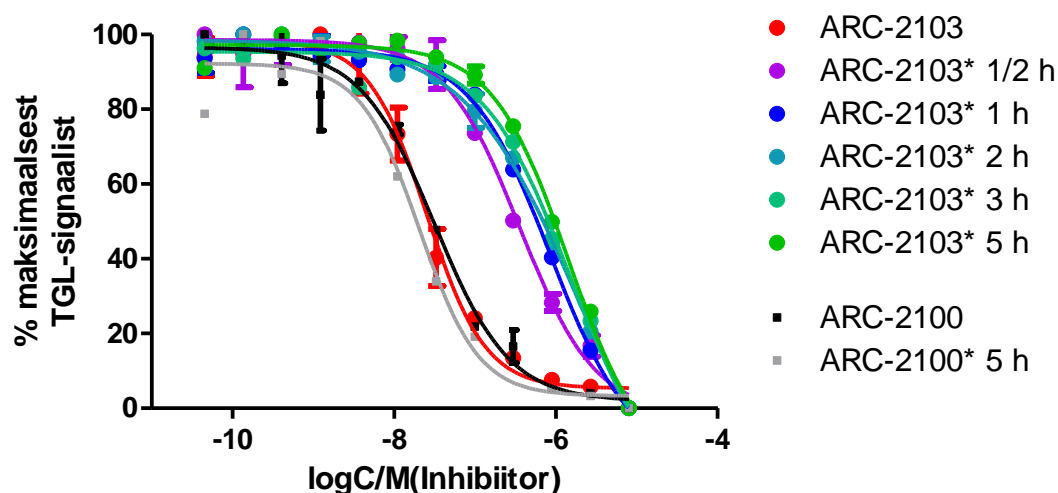
## 4.2. Kiiritatud ühendite iseloomustamine

Lähtudes kirjanduses välja pakutud reaktsioonidest võiks ARC-2103 lagunemine kulgeda järgneva skeemi kohaselt (skeem 8) [32,37].



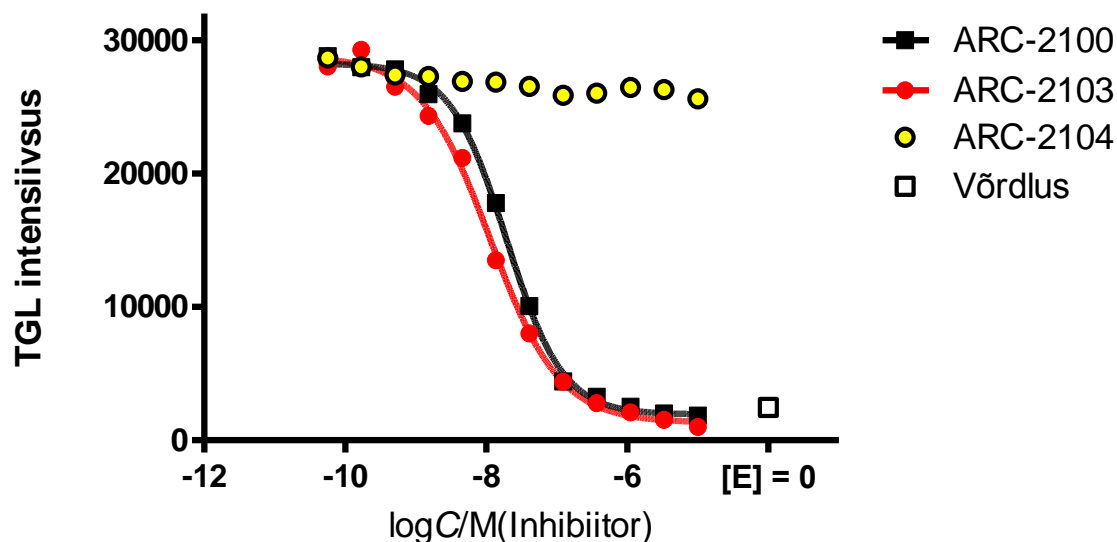
**Skeem 8.** Kirjanduse põhjal eeldatav ARC-2103 kiiritamisel kulgev reaktsioniskeem [32,37].

Kiiritamiskatsete esimese etapina optimeeriti ARC-2103 kiiritamisaega. ARC-2103 proove kiiritati viie tunni vältel ning iseloomustati saadud proovide võimet seonduda PKAc-ga. Kiiritamise katsed näitasid, et tunni aja jooksul langes ARC-2103 seondumisvõime PKAc-le 20 korda ja pärast ühte tundi kiiritamist ei andnud edasine kiiritamine enam märkimisväärset efekti (Joonis 13). Võrdluseks kiiritati ka fotovahelülita ühendit ARC-2100 (5 h), mille sidumisvõime katse jooksul ei muutunud (Joonis 13).

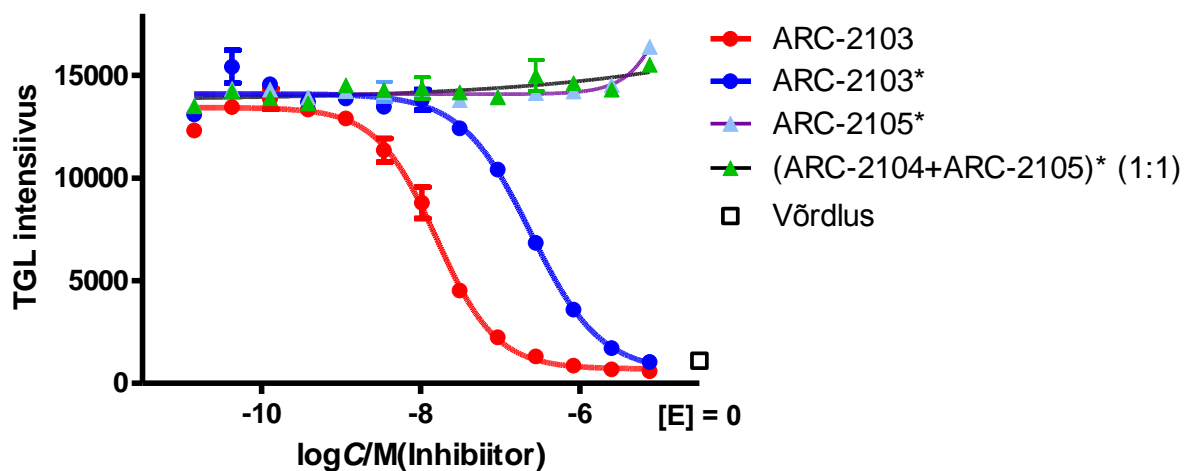


**Joonis 13.** TGL mõõtmiste tulemused viie tunnises kiiritamise katses (2 paralleelkatse tulemused). Tärn tähistab kiiritatud proove. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 sondi lõppkontsentratsioon oli 10 nM.

Lagusaaduse ARC-2104 ja fotolagundatud ARC-2105 iseloomustamiseks ei sobinud enam ARC-1182 sondil põhinev meetod, kuna antud kontsentratsioonipiirkonnas väljatõrjumist ei toimunud, mille tõttu kasutati teist meetodit (Joonis 14 ja 15).

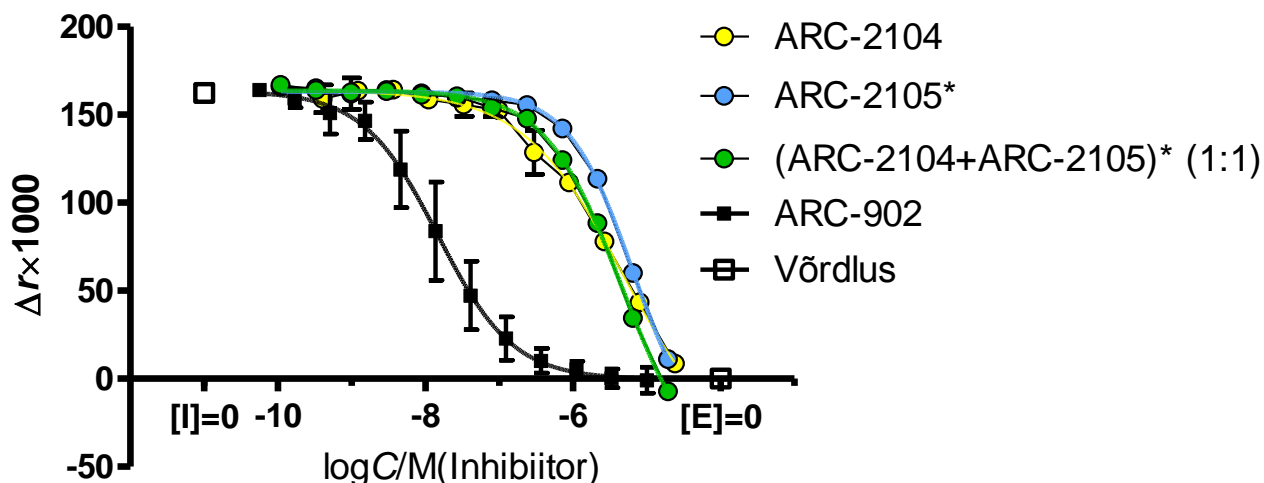


**Joonis 14.** TGL mõõtmiste tulemused, kus võrreldakse ARC-2103, ARC-2100 ja ARC-2104. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 sondi lõppkontsentratsioon oli 10 nM.



**Joonis 15.** TGL mõõtmiste tulemused, kus ARC-2103 on kiiritamata ning ARC-2103\*, ARC-2105\* ja ARC-2104:ARC-2105\* segu kiiritati 1 h (2 paralleelkatse tulemused). Tärn tähistab kiiritatud proove. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 sondi lõppkontsentratsioon oli 10 nM.

Lagusaaduste ARC-2104 ja ARC-2105 iseloomustamiseks võeti kasutusele FA mõõtmiste süsteem, kus fluoretsentssondina kasutati ARC-583 ( $K_D = 0,5$  nM) (joonis 16). ARC-2104, ARC-2105 ning nende segu mõõdeti võrreldes mõõduka seondumisvõimega ainega ARC-902 ( $K_D = 1$  nM).



**Joonis 16.** FA tulemuste mõõtmiste tulemused, kus ARC-2104 ei kiiritatud, kuid ARC-2105 ja ARC-2104+ARC-2105 segu kiiritati 1 h, ARC-902 ei kiiritatud (2–4 paralleelkatse tulemused). Tärn tähistab kiiritatud proove. PKAc lõppkontsentratsioon oli 3 nM, fluoretsentssondi ARC-583 lõppkontsentratsioon oli 2 nM.

ARC-2104 ( $K_D = 430 \pm 6$  nM) seondumisvõime oli pisut kõrgem kui ARC-2105-l ( $K_D = 670 \pm 20$  nM), mis oli ka eeldatav, kuna ATP-taskusse seonduvate inhibiitorite seondumisvõime on enamasti kõrgem kui valgu sidumispirkonda seonduvad inhibiitoritel. Eeldatavate lagusaaduste segu (ARC-2104+ fotolagundatud ARC-2105) seondumisvõime ( $K_D = 350 \pm 22$  nM) ei küündinud fotolagundatud ARC-2103 seondumisvõimeni ( $K_D = 0,66 \pm 0,50$  nM). Sünteesitud lagusaaduste segu inhibeerimisvõime oli sama suur puhaste komponentide inhibeerimisvõimega, järelikult ei ole sünteesitud lagusaaduste vahel sünergistlikku sidumist.

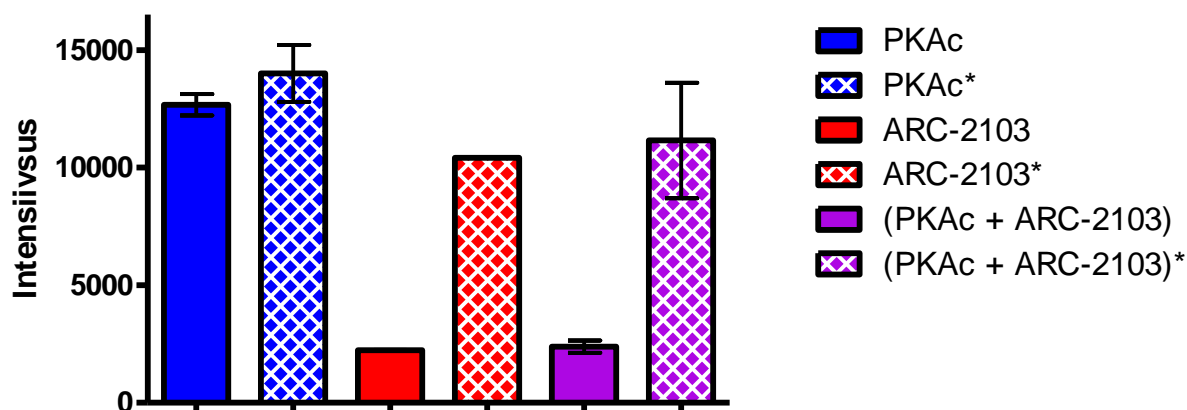
Kiiritatud ARC-2103 ja ARC-2105 proovide lahuseid analüüsiti HPLC-MS-iga. Kiiritatud ARC-2103 HPLC-analüüs näitas, et aine on 1 h jooksul täielikult ära lagunenuk ning tekkinud on kaks lagusaadust (Lisa 12). Ühe lagusaadusena tuvastati ARC-2104 (Lisa 13), mis vastab kirjanduses väljapakutud lagunemise reaktsiooniskeemile. Teise lagusaaduse mass ei vastanud kirjanduse põhjal eeldatud lagusaaduse massile ( $MW = 1344$  Da) (Lisa 13). ARC-2103-le vastava retentsioonajaga piike kromatogrammilt ei esinenud. Lähteainete lisamine analüüsisegule võimaldas ARC-2103 detekteerida, mis näitab, et antud katsetingimustes oli ARC-2103 kiiritamise toimet täielikult lagunenuk.

Kui kiiritatud ARC-2103 proovi HPLC analüüsil ei olnud kiiritamata lähteaine piiki näha, siis kiiritatud ja kiiritamata ARC-2103 proovidest valmistatud segu HPLC analüüsil ilmus kromatogrammile ka ARC-2103 piik (Lisa 12).



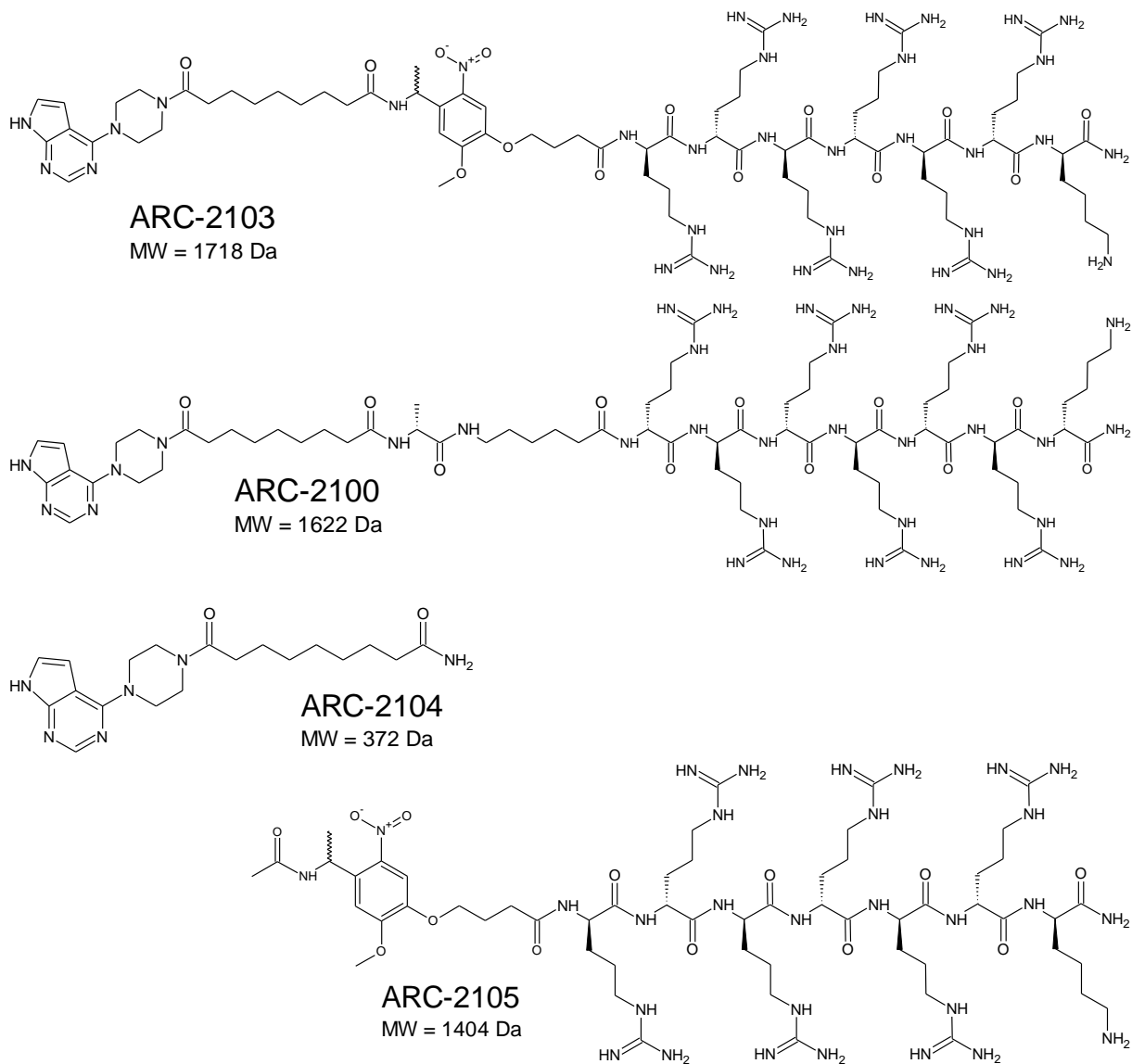
ARC-2105 kromatogrammilt oli näha, et ka ARC-2105 oli 1 h jooksul täielikult lagunenu ning tekkinud oli uus piik, mille mass-spekter ning retentsiooniaeg kattusid ARC-2103 kiiritamisel saadud laguproduktiga (Lisad 12 ja 13).

Kontrollimaks, ega PKAc 1 h kiiritamise jooksul aktiivsust ei kaota, viidi läbi ARC-2103-PKAc kompleksi kiiritamise katse (Joonis 17). Võrdlusena kasutati vaba PKAc lahust. Tulemustest on näha, et kiiritamine ei vähendanud aktiivse PKAc kontsentratsiooni. PKAc-ga kompleksis oleva ARC-2103 fotolagundamine andis samad tulemused võrreldes puhta ARC-2103 fotolagunemisega. Seega võib järeldada, et fotolagundatava vahelüliga ühendi ARC-2103 lagundamine kinaasi juuresolekul on sama efektiivne kui ilma kinaasita ja antud struktuur sobib rakendamiseks PKAc fotolagundatava inhibiitorina.



**Joonis 17.** TGL mõõtmiste tulemused PKA kiiritamise katses, kus kõiki lahuseid kiiritati 1 h (2–3 paralleelkatse tulemused). Tärn tähistab kiiritatud proove. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 soni lõppkontsentratsioon oli 10 nM.

Töö käigus tahkel faasil sünteesitud ained on toodud joonisel 18. Töös iseloomustatud ainete  $IC_{50}$  ja  $K_D$  väärtused on toodud lisas 16.



**Joonis 18.** Töös sünteesitud ARC-2103, ARC-2100, ARC-2104 ja ARC-2105 struktuurid.

## 5. Kokkuvõte

Antud töö eesmärgiks oli sünteesida fotolagundatav cAMP-sõltuva proteiinkinaasi inhibiitor ning iseloomustada selle bioloogilist aktiivsust.

Töö käigus sünteesiti ja puhastati fotolaguneva vahelüliga cAMP-sõltuv proteiinkinaasi inhibiitor ARC-2103 ja kolm erinevat võrdlusainet ARC-2100, ARC-2104 ning ARC-2105. Süntees viidi läbi kasutades lahusefaasi meetodeid ning tahkefaasi Fmoc sünteesistrateegiat. Ainete bioloogilise aktiivsuse iseloomustamiseks kasutati aeglahutusega luminesentsi ja fluorestsentsanisotroopia mõõtmistel põhinevaid meetodeid.

Tööst selgus, et painduva vahelüli asendamine jäigema fotolaguneva vahelüliga ei muutnud ühendi sidumisvõimet PKAc suhtes. ARC-2103 määrati väga kõrge sidumisvõime cAMP-sõltuva proteiinkinaasi suhtes ( $K_D = 39 \pm 21$  pM), mis vähenes tunniajase kiiritamise jooksul 20 korda. Tehti kindlaks, et konstrueeritud fotolagunevat inhibiitorit saab kasutada optimeeritud tingimustes cAMP-sõltuva PK kompleksist vabastamiseks kiiritamise toimet.

## 6. Summary

### Photo-cleavable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase

The aim of given thesis was to synthesise a photo-cleavable inhibitor for cAMP-dependent protein kinase and to characterize its biological activity.

A cAMP-dependent protein kinase inhibitor with a photo-destructable linker was synthesised (ARC-2103) along with three comparison substances (ARC-2100, ARC-2104 and ARC-2105). Synthesis was preformed using liquid phase synthesis and Fmoc solid phase synthesis. The biological activities of synthesised substances were characterized with methods based on time gated luminescence and fluorescence anisotropy.

The replacement of a flexible linker with a more rigid photo-cleavable linker in the inhibitors structure displayed no loss of affinity towards PKAc. ARC-2103 proved to be a high-affinity ligand with pikomolar  $K_D$  values ( $K_D = 39 \pm 21$  pM). ARC-2103 suffered a 20 time affinity loss during one hour of UV irradiation. The constructed photo-cleavable inhibitor can be used to inhibit cAMP-dependent PK and release it from its complex with UV irradiation.

## 7. Kasutatud Kirjandus

1. Schwartz, P. A.; Murray, B. W. Protein Kinase Biochemistry and Drug Discovery. *Bioorg Chem.* 2011. 39, 5–6, 192–210.
2. Hunter, T. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012. 367, 1602, 2513–2516.
3. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science.* 2002. 298, 5600, 1912–1934.
4. Taylor, S. S.; Yang, J.; Wu, J.; Haste, N. M.; Radzio-Andzelm, E.; Anand, G. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 2004.11, 1697, 1–2, 259–269.
5. Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. W. H. Freeman: New York, 2000.
6. Stefan Knapp and Michael Sundström. Recently targeted kinases and their inhibitors — the path to clinical trials. *Curr Opin Pharmacol.* 2014. 17, 58–63
7. Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem Rev.* 2001. 101, 8, 2271–2290.
8. Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. 11, 9–22.
9. Gerlits, O.; Tian, J.; Das, A.; Taylor, S.; Langan, P.; Heller, W. T.; Kovalevsky, A. Phosphoryl transfer reaction snapshots in crystals: Insights into the mechanism of protein kinase A catalytic subunit. *J Biol Chem.* 2015.
10. Kristallstruktuur RCSB Protein Data Bank leheküljelt, PDB ID 3TNP, autorid: Zhang, P., Smith-Nguyen, E.V., Keshwani, M.M., Deal, M.S., Kornev, A.P., Taylor, S.S., töödeldud programmiga Pymol. Viimati alla laetud 05.05.2015 lehekülelt: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3TNP>
11. Kristallstruktuur RCSB Protein Data Bank leheküljelt, PDB ID 4DH3, autorid: Kovalensky, A.Y., Langan, P., töödeldud programmiga Pymol. Viimati alla laetud 05.05.2015 lehekülelt: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4DH3>
12. Knight, Z. A.; Shokat, K. M. Features of Selective Kinase Inhibitors. *Chem Biol.* 2005. 12, 6, 621–637.
13. Fabbro, D.; Cowan-Jacob, S. W.; Moebitz, H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br J Pharmacol.* 2015. 172, 11, 2675–2700.

14. Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat rev Cancer*. 2009. 9, 1, 28–39.
15. Karman, M.; Herrgard, S.; Treibal, D., et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2008. 26, 1, 127–132.
16. Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: from Principle to Practical. *Chem Med Chem*. 2010. 5, 1, 23–24.
17. Uri, A.; Lust, M.; Vaasa, A.; Lavogina, D.; Viht, K.; Enkvist, E. Bisubstrate fluorescent probes and biosensors in binding assays for HTS of protein kinase inhibitors. 2010. 1804, 3, 541–546.
18. Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-affinity bisubstrate probe for fluorescence anisotropy binding/displacement assays with protein kinases PKA and ROCK. *Anal Biochem*. 2008. 385, 1, 85–93.
19. Viht, K. Immobilizable Bisubstrate-Analogue Inhibitors of Basophilic Protein Kinases: Development and Application in Biosensors. Diplomitöö, Tartu Ülikool, 2007.
20. Enkvist, E.; Lavogina, D.; Raidaru, G.; Vaasa, A.; Viil, I.; Lust, M.; Viht, K.; Uri, A. Conjugation of adenosine and hexa-(D-arginine) leads to a nanomolar bisubstrate-analog inhibitor of basophilic protein kinases. *J Med Chem*. 2006. 49, 24, 7150–7159.
21. Viira, B. Synthesis of inhibitors for protein kinases PKA and PKB. Master thesis, Tartu Ülikool, 2012.
22. Enkvist, E.; Viht, K.; Bischoff, N.; Vahter, J.; Saaver, S.; Raidaru, G.; Issinger, O. G.; Niefindb, K.; Uri, A. A subnanomolar fluorescent probe for protein kinase CK2 interaction studies. *Org Biomol Chem*. 2012. 10, 43, 8645.
23. Braslavsky, E. S.; Glossary terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl Chem*. 2007. 79, 3, 293–465.
24. Behlke, M. A.; Huang, L.; Bogh, L.; Rose, S.; Devor, E. J. Fluorescence and Fluorescence Applications. Integrated DNA Technologies. 2005.
25. Hagan, A. K.; Zuchner, T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Anal Bioanal Chem*. 2011. 400, 9, 2847–2864.
26. Klàn, P.; Wirz, J. Photochemistry of Organic Compounds. Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2009, 25–29.
27. Lakowicz, J. R.; Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third edition. Baltimore, Mayland, USA. 2006. 1–18, 353–354.
28. Song, X.; Quirk, S. Time-Resolved Luminescence Detection and Imaging Promises a Bright Future. *J Biosens Bioelectron*. 2012. 3, 5, 1–3.

29. Kasari, M.; Ligi, K.; Williams, J. A. G.; Vaasa, A.; Enkvist, E.; Viht, K.; Pålsson, L. O.; Uri, A. Responsive microsecond-lifetime photoluminescent probes for analysis of protein kinases and their inhibitors. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2013. 1834, 7, 1330–1335.
30. Lee, H.-M.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. Illuminating the Chemistry of Life: Design, Synthesis, and Applications of “Caged” and Related Photoresponsive Compounds. *ACS. Chem. Biol.* 2009. 4, 6, 409–427.
31. Ellis-Davies, G.; Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat Methods.* 2007. 4, 8, 619–628.
32. Goeldner, M.; Givens, R. *Dynamic Studies in Biology.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim: Federal Republic of Germany, 2005.
33. Riggsbee, C.W.; Deiters, A. Recent advances in the photochemical control of protein function. *Trends Biotechnol.* 2010. 28, 9, 468–75.
34. Holmes, C. P.; Jones, D. G. Reagents for combinatorial organic synthesis: development of new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis. *J Org Chem.* 1995. 60, 2318.
35. Mabuchi, M.; Shimizu, T.; Haramura, M.; Tanaka, A. Identification and Purification of Target Protein using Affinity Resin Bearing a Photo-labile Linker. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015.
36. Russell, A. G.; Ragoussi, M-E.; Ramalho, R.; Wharton, C. W.; Carteau, D.; Bassani D. M.; Snaith, J. S.  $\alpha$ -Carboxy-6-nitroveratryl: A Photolabile Protecting Group for Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* 2010. 75, 13, 4648–4651.
37. Shigeri, Y.; Tatsu, Y.; Yumoto, N. Synthesis and application of caged peptides and proteins. *Pharmacol Ther.* 2001. 91, 2, 85–92.
38. Rinnová, M.; Nováková, M.; Kasicka, V.; Jiráček J. Side Reactions during Photochemical Cleavage of an  $\alpha$ -Methyl-6-nitroveratryl-based Photolabile Linker. *J Pept Sci.* 2000. 6, 8, 355–365.
39. Geißler, D.; Antonenko, Y. N.; Schmidt, R.; Keller, S.; Krylova, O. O.; Wiesner, B.; Bendig, J.; Pohl, P.; Hagen, V. (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces. *Angew Chem, Int Ed.* 2005. 44, 8, 1195–1198.
40. Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chem. Biol.* 2011. 6, 10, 1052–1062.

41. Lavogina, D.; Lust, M.; Viil, I.; König, N.; Raidaru, G.; Rogozina, J.; Enkvist, E.; Uri, A.; Bossemeyer, D. Structural Analysis of ARC-Type Inhibitor (ARC-1034) Binding to Protein Kinase A Catalytic Subunit and Rational Design of Bisubstrate Analogue Inhibitors of Basophilic Protein Kinases. *J Med Chem.* 2009, 52, 2, 308–321.
42. Hames, B. D.; Chan, W. C.; White, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis: A Practical Approach. Oxford, New York. 2000. 9-13, 57.
43. Wang, Z. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS lett.* 1995. 360, 2, 111-114.



## 8. Lisad

**Lisa 1.** Töös kasutatud fluorestsentssondid ja võrdlusained (kahel lehel).

**Lisa 2.** PIPY TMR  $H^1$  ja  $C^{13}$  spektrid (kahel lehel).

**Lisa 3.** ARC-2100 ning ARC-2100 kõrvalsaaduse MALDI-TOF spektrid (kahel lehel).

**Lisa 4.** Puhastatud ARC-2100 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

**Lisa 5.** Puhastatud ARC-2103 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

**Lisa 6.** Puhastatud ARC-2104 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

**Lisa 7.** Puhastatud ARC-2105 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

**Lisa 8.** Töös sünteesitud ARC-2100 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

**Lisa 9.** Töös sünteesitud ARC-2103 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

**Lisa 10.** Töös sünteesitud ARC-2104 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

**Lisa 11.** Töös sünteesitud ARC-2105 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

**Lisa 12.** Fotolagundatud ARC-2103, ARC-2105 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid (kahel lehel).

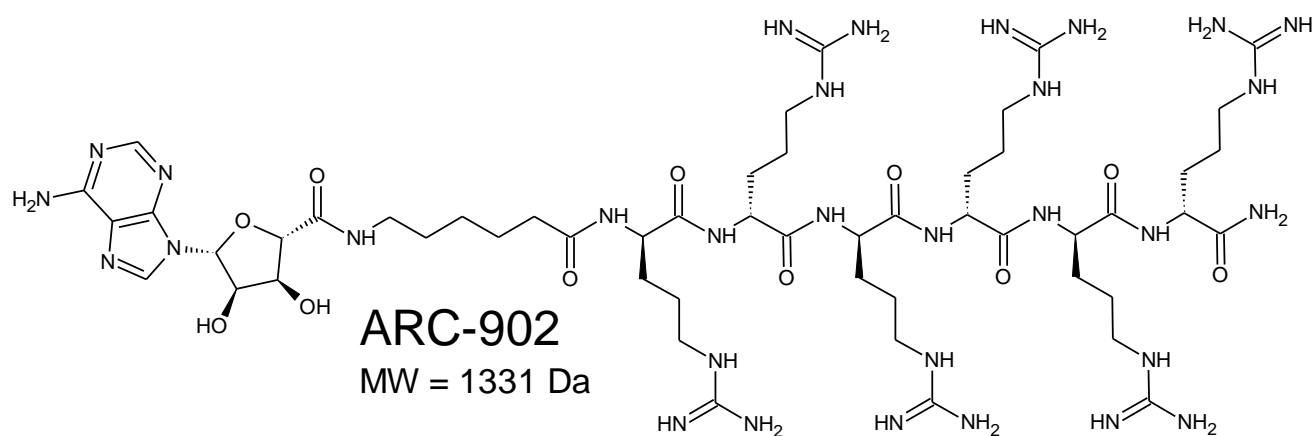
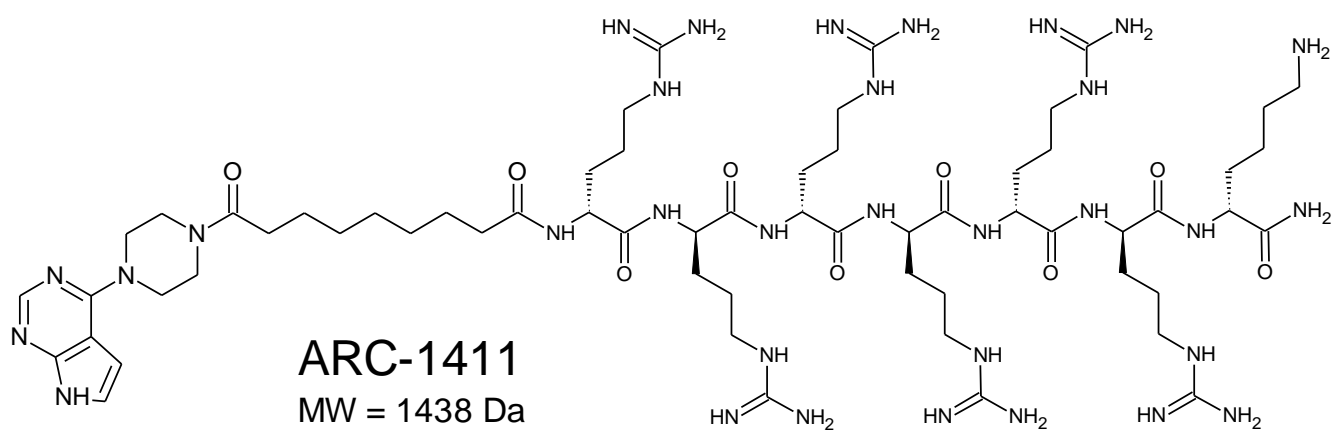
**Lisa 13.** Fotolagundatud ARC-2103 ja ARC-2105 massispektrid ja UV spektrid.

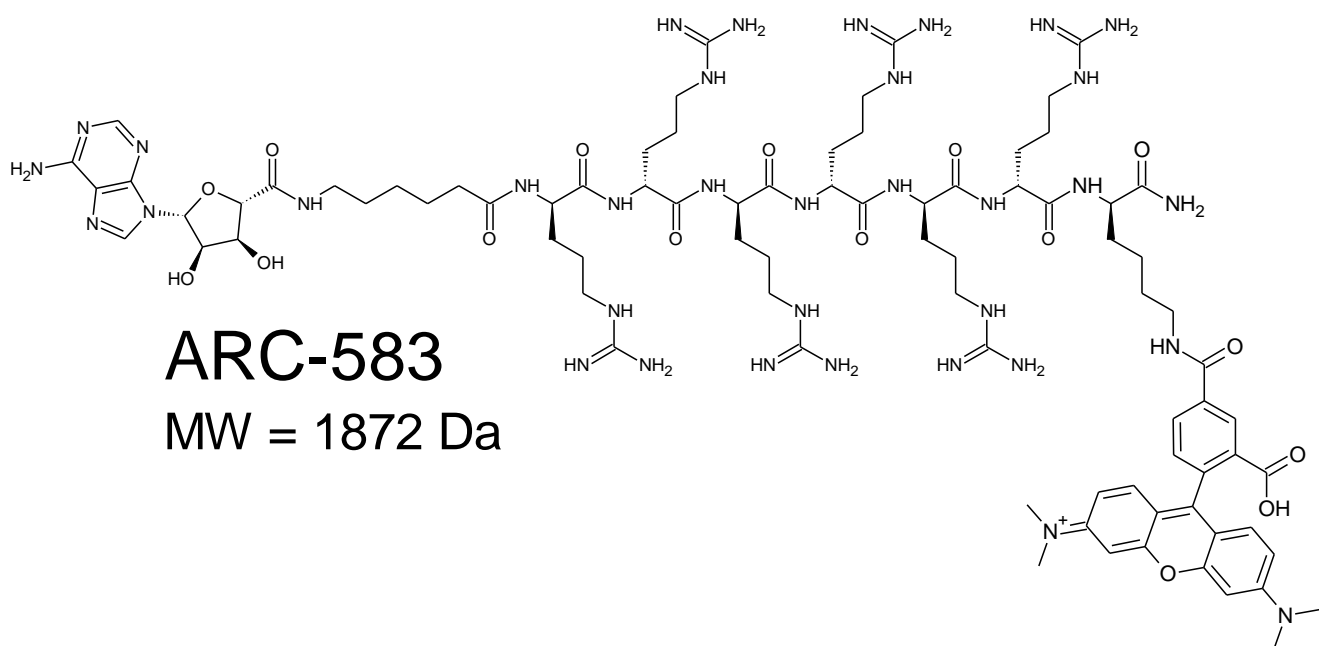
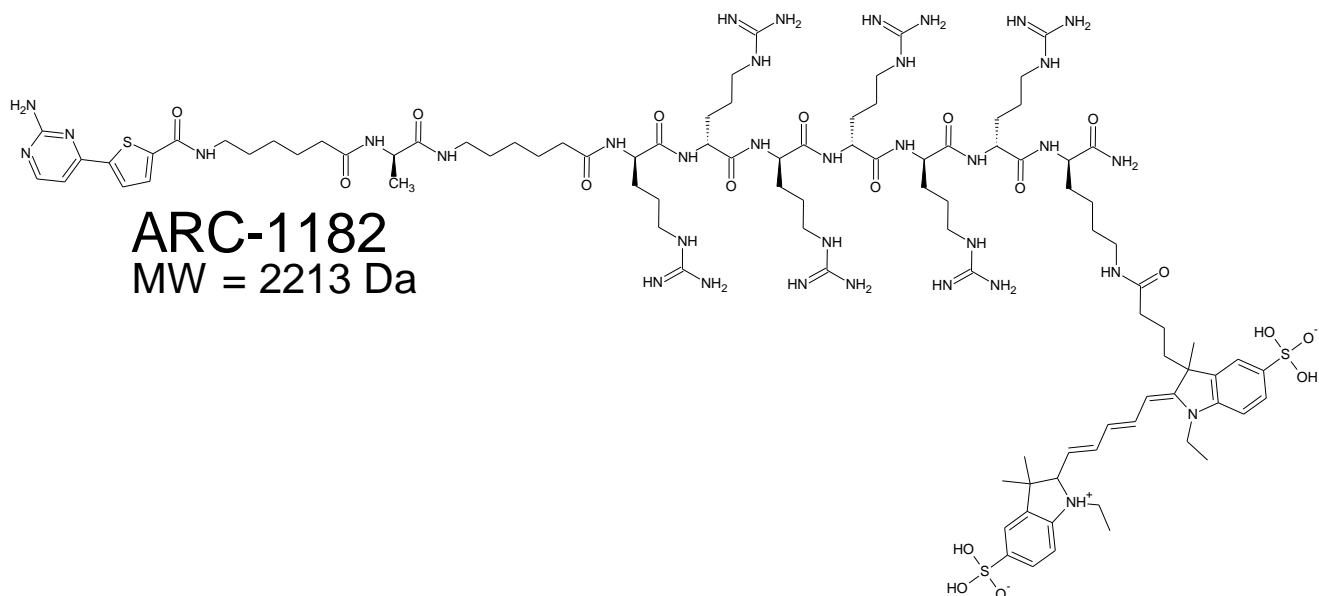
**Lisa 14.** Võrdlusaine ARC-1411 ja fotolagundatud aine ARC-2103 sidumiskõverad

**Lisa 15.** Simuleeritud kõverad.

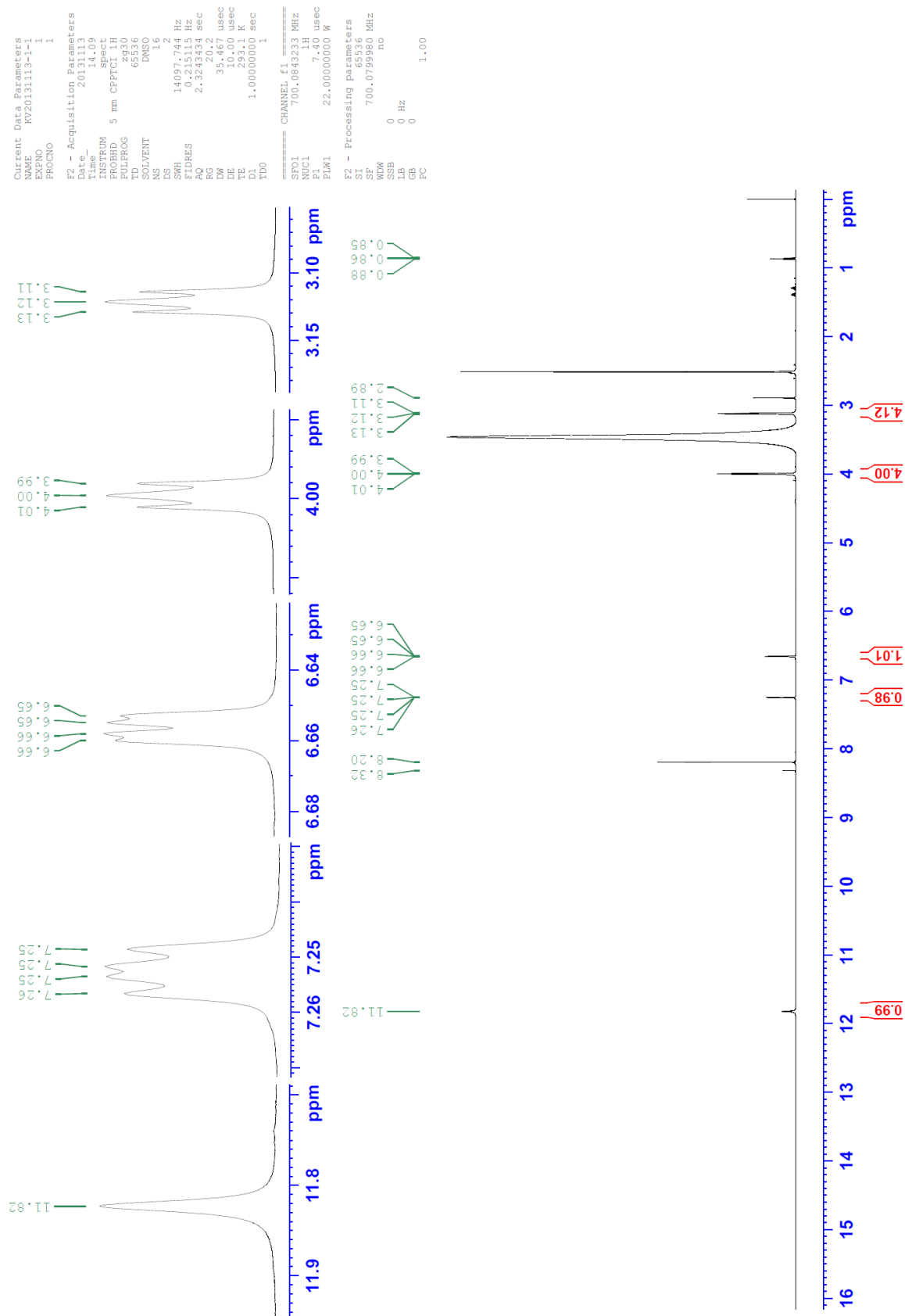
**Lisa 16.** Töös mõõdetud ARC-ide  $IC_{50}$  ja  $K_D$  väärtused koos struktuuridega.

**Lisa 1.** ARC-1411, ARC-902, ARC-583 ja ARC-1182 struktuurid (kahel lehel)





**Lisa 2.** PIPY TMR  $H^1$  ja  $C^{13}$  spektrid (kahel leheküljel).



```

Current Data Parameters
NAME      KZ20131113-1-2
EXPNO     2
PROCNO    1

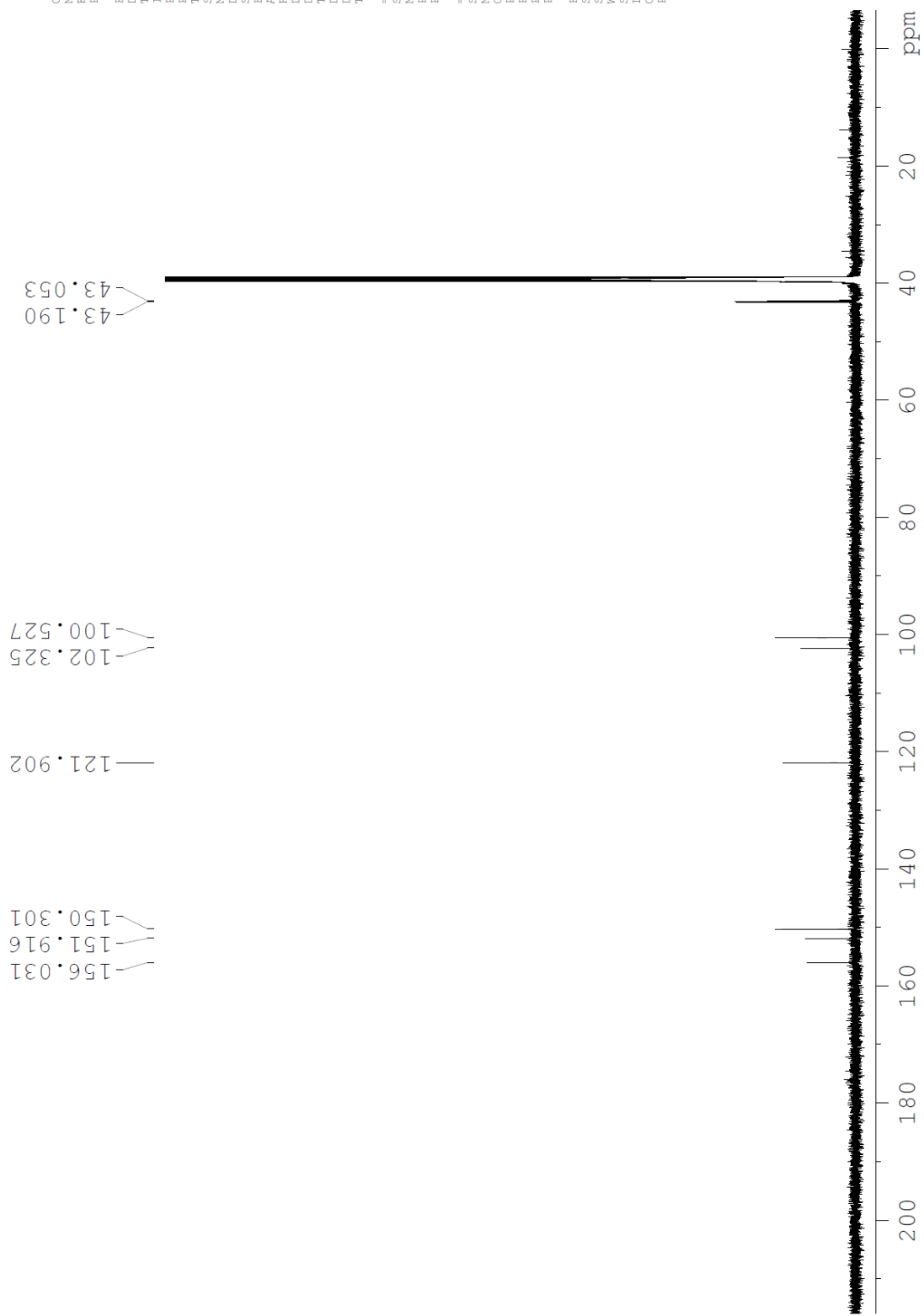
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20131113
Time      14.34
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPYCI 1H
PULPROG   zgpg30
TD        83328
SOLVENT   DMSO
NS         200
DS         4
SWH        41666.668 Hz
FIDRES     0.500032 Hz
AQ         0.9999360 sec
RG         2000
DM         12.000 usec
DE         18.00 usec
TE         293.2 K
D1         7.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1       176.0528587 MHz
NUC1       13C
P1         12.40 usec
PLW1       198.0000000 W

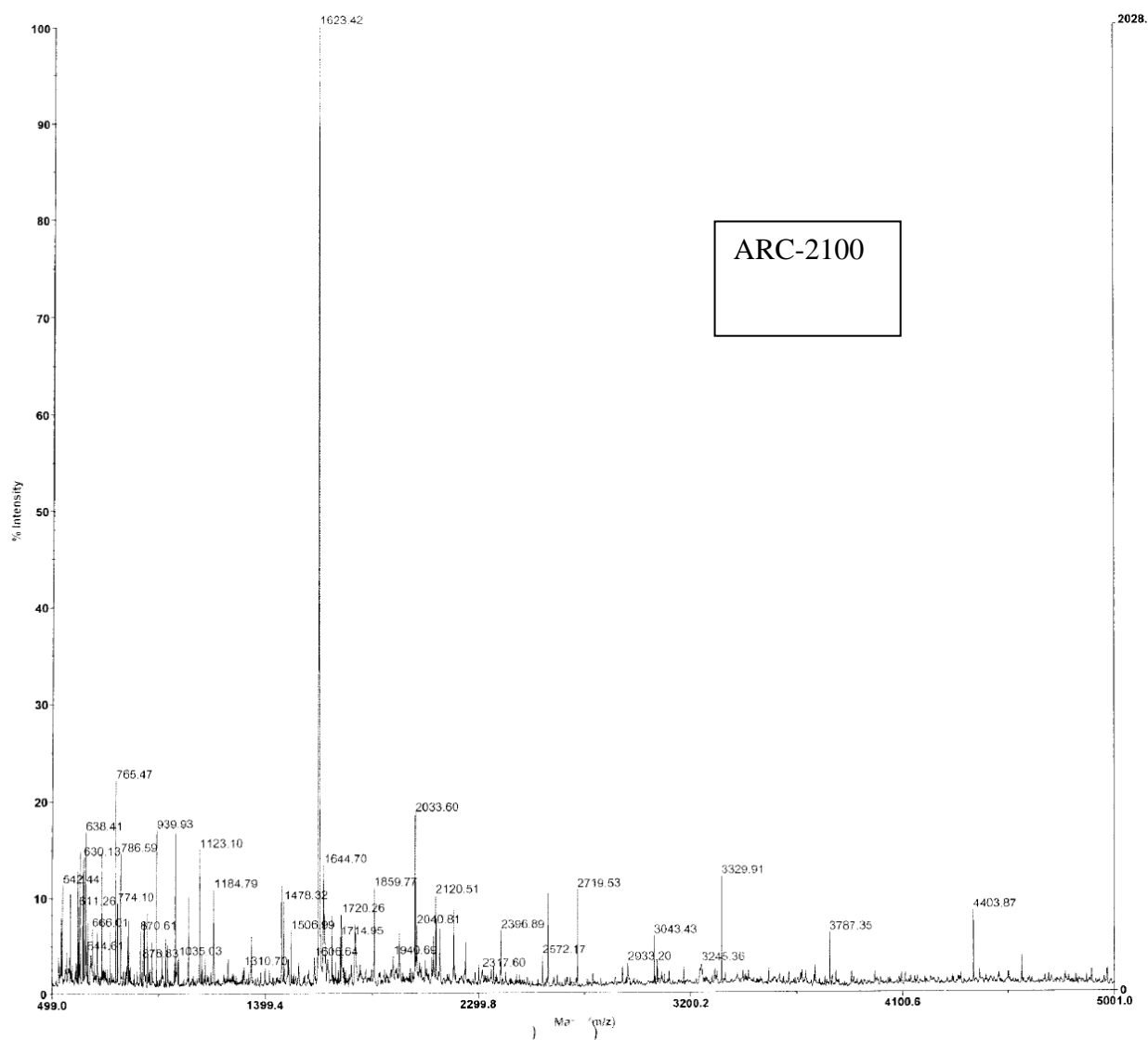
===== CHANNEL f2 =====
SFO2       700.0628003 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2    waltz16
F2P2       22.0000000 usec
PLW2       22.0000000 W
PLW12      0.28514001 W
PLW13      0.12047000 W

F2 - Processing parameters
SI         131072
SF         176.0353610 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

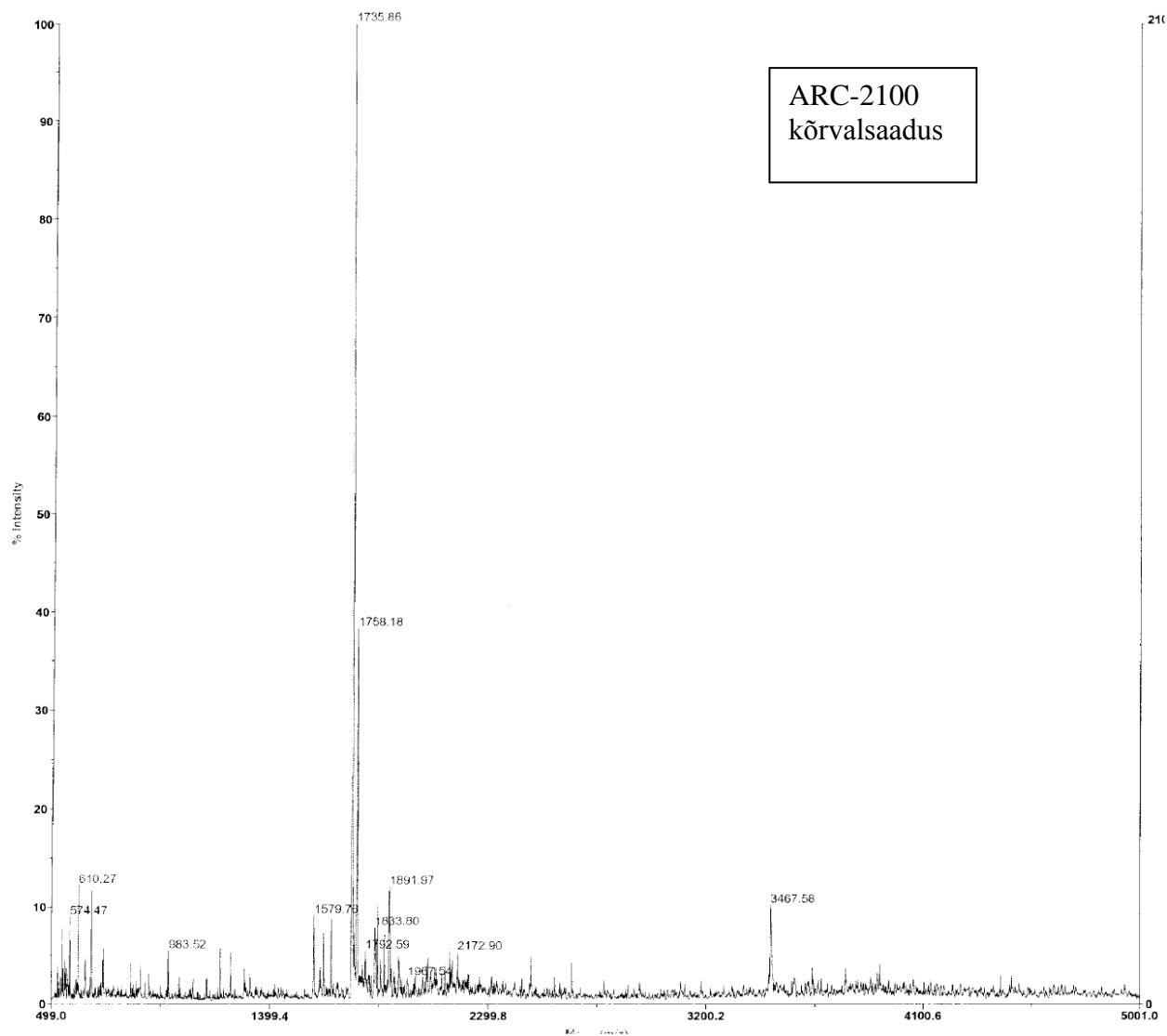
```



**Lisa 3.** ARC-2100 ning ARC-2100 kõrvalsaaduse MALDI-TOF spektrid (kahel lehel).

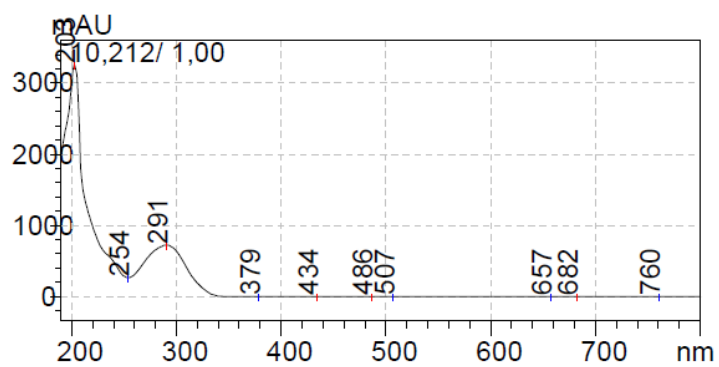
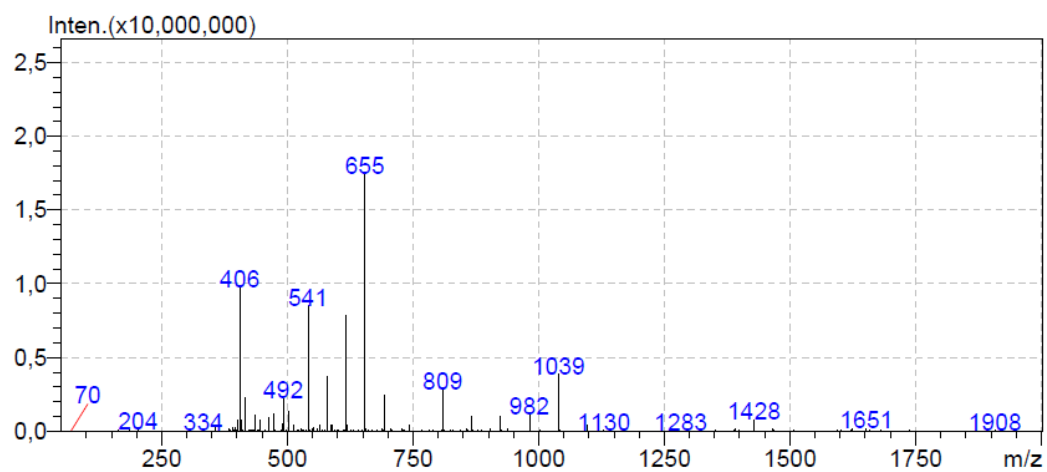
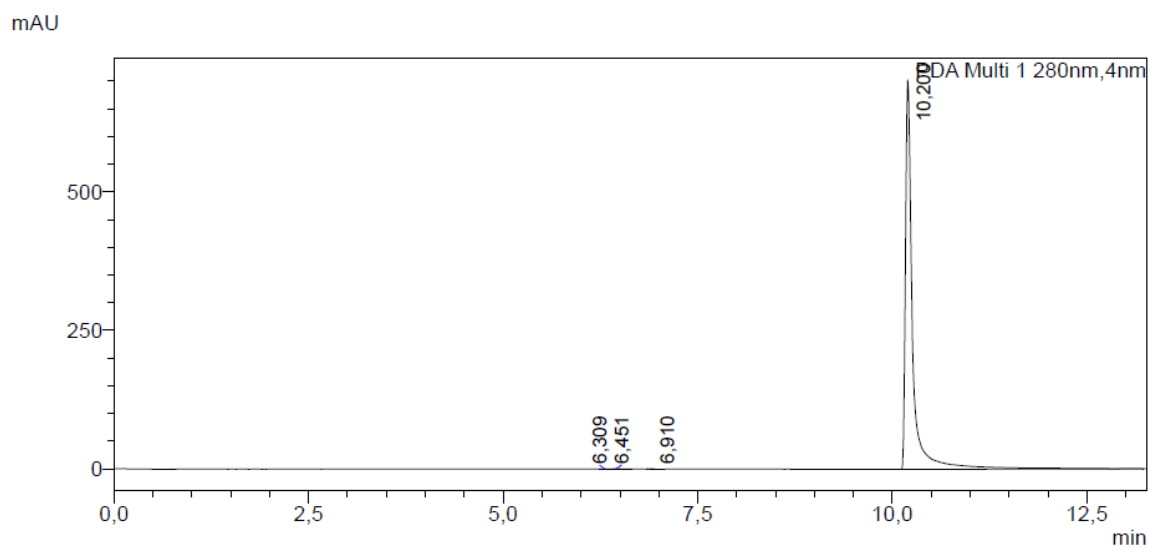


Acquired: 13:28:00, November 27, 2013



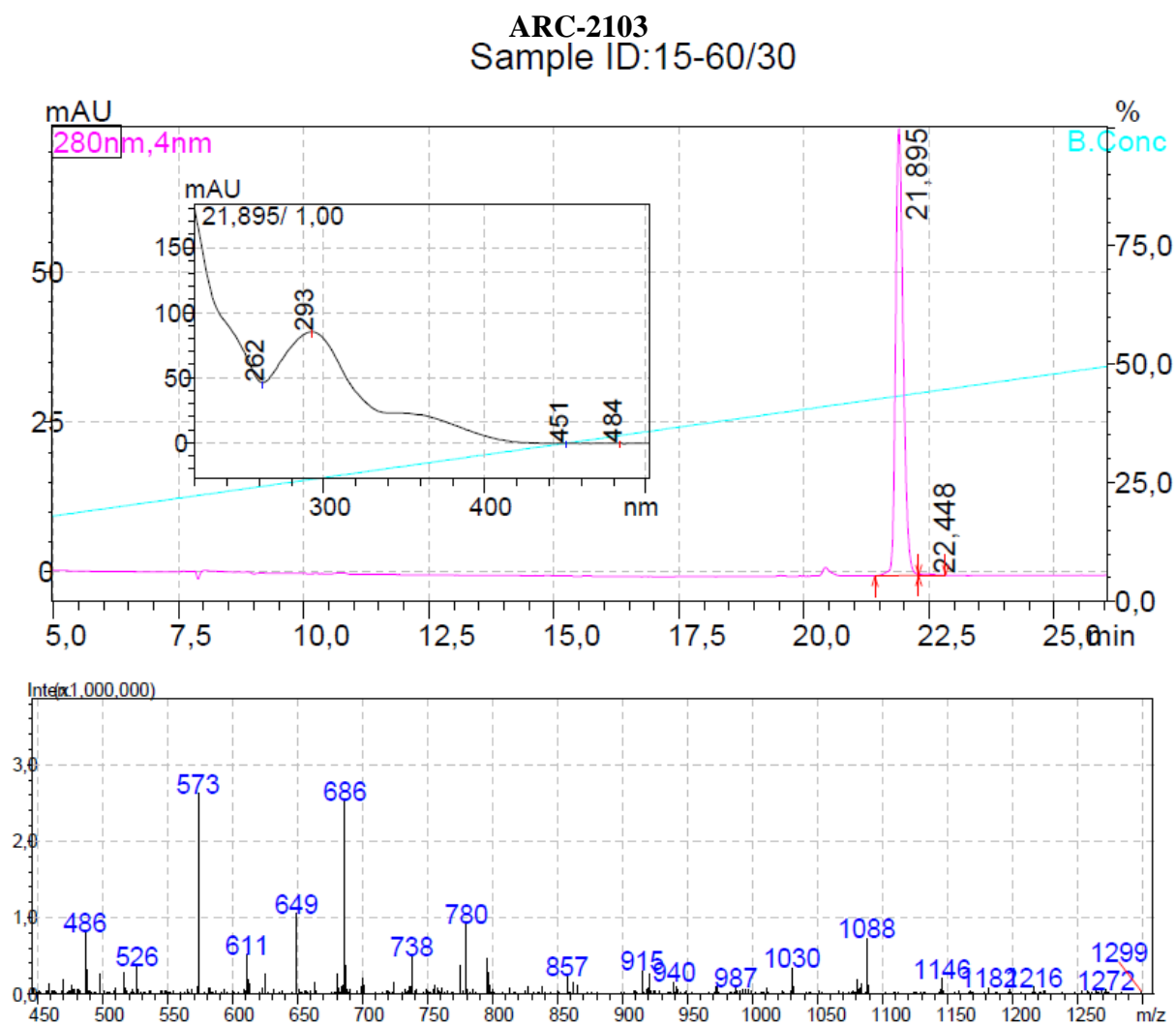
**Lisa 4.** Puhastatud ARC-2100 HPLC kromatogramm ja UV spektrid.

### ARC-2100





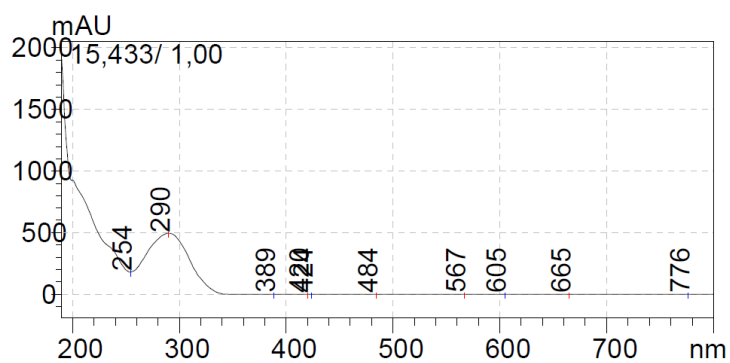
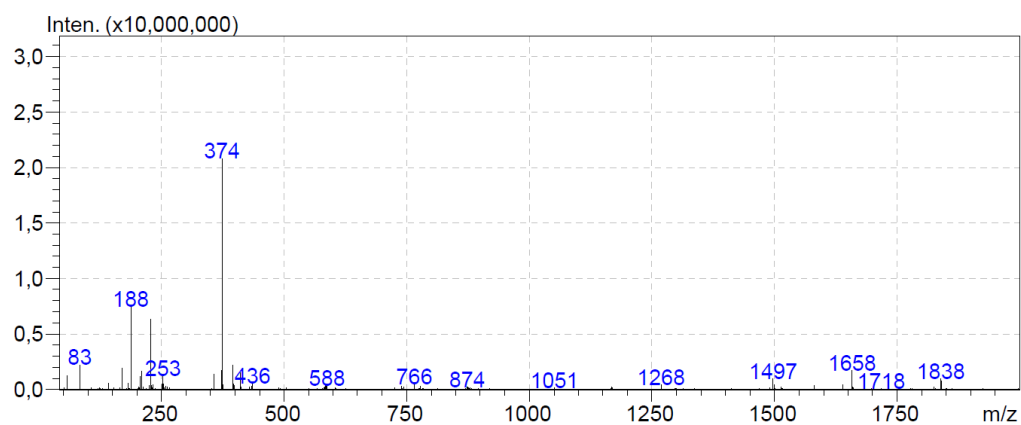
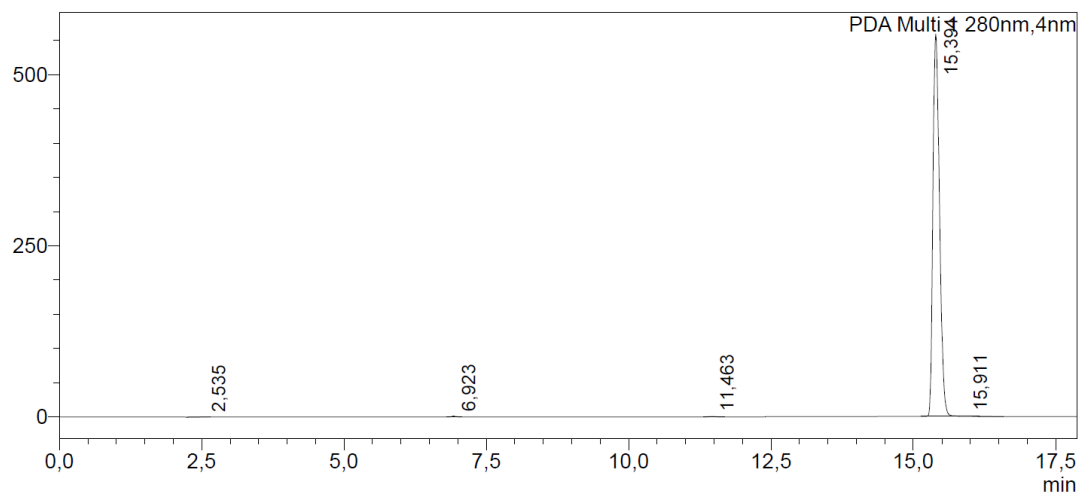
**Lisa 5.** Puhastatud ARC-2103 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.



**Lisa 6.** Puhastatud ARC-2104 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

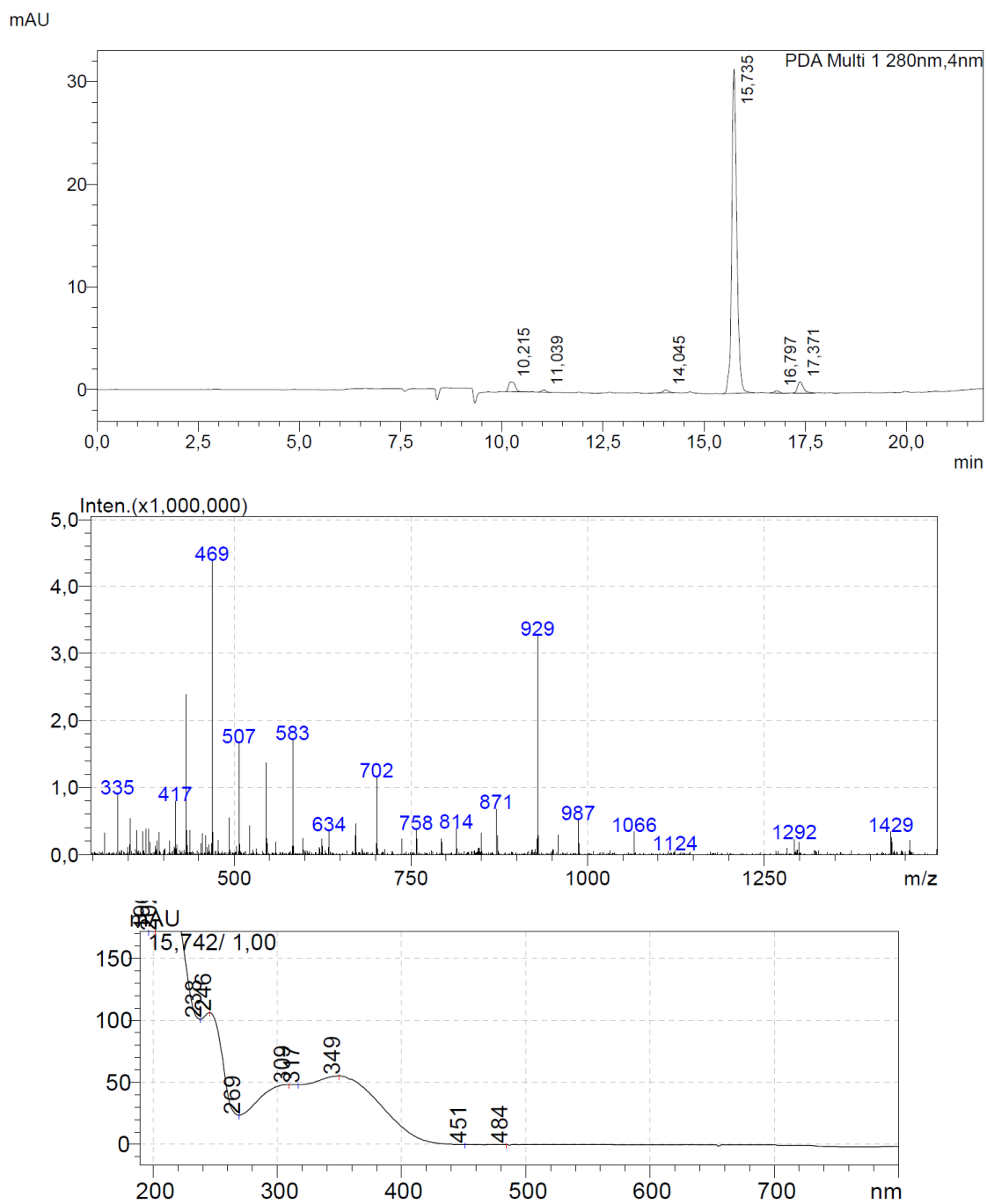
### ARC-2104

mAU



**Lisa 7.** Puhastatud ARC-2105 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid.

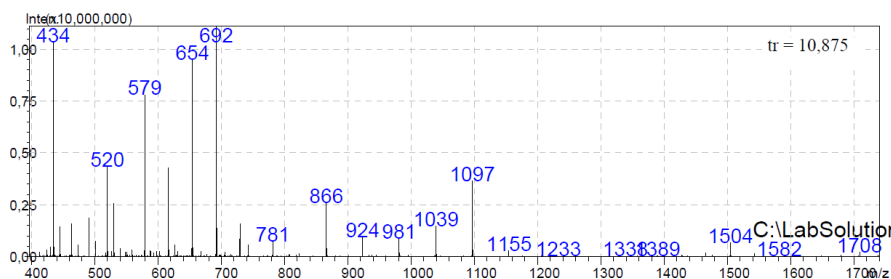
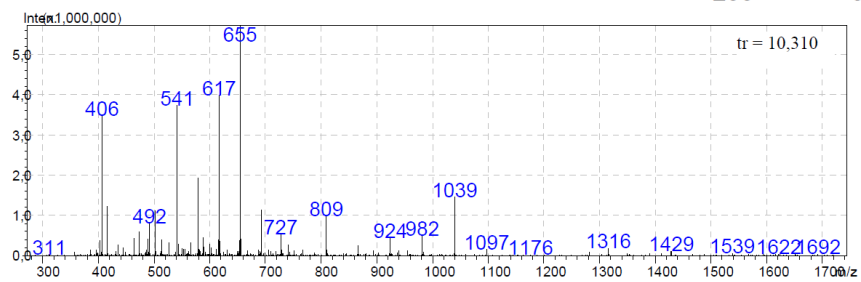
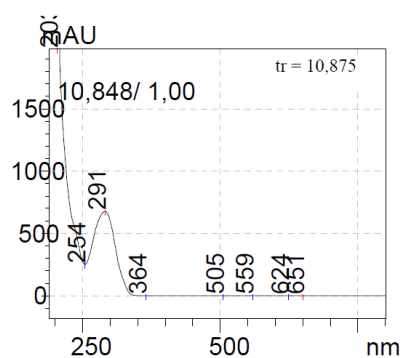
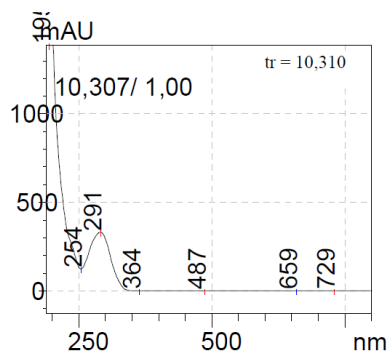
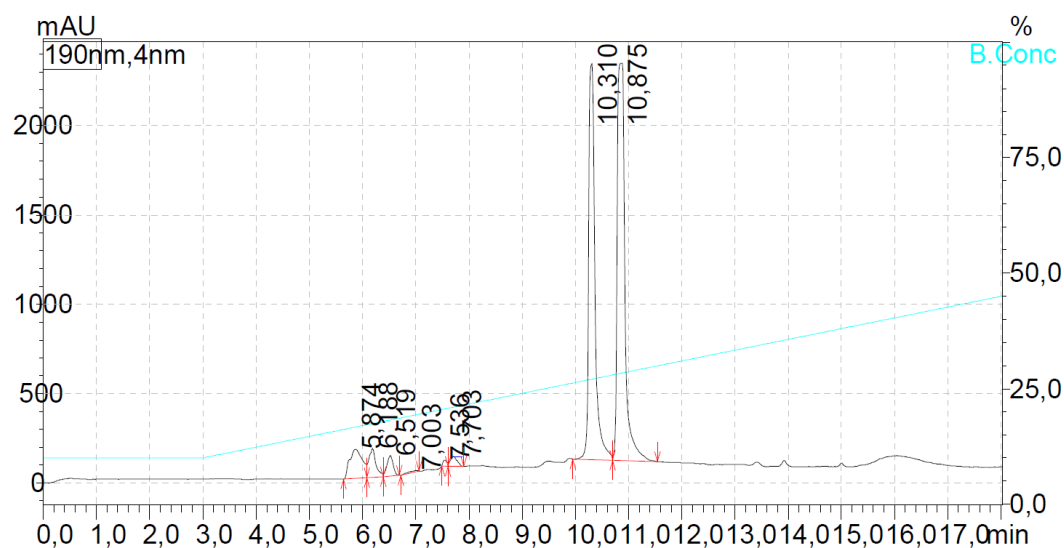
### ARC-2105



**Lisa 8.** Töös sünteesitud ARC-2100 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

### ARC-2100

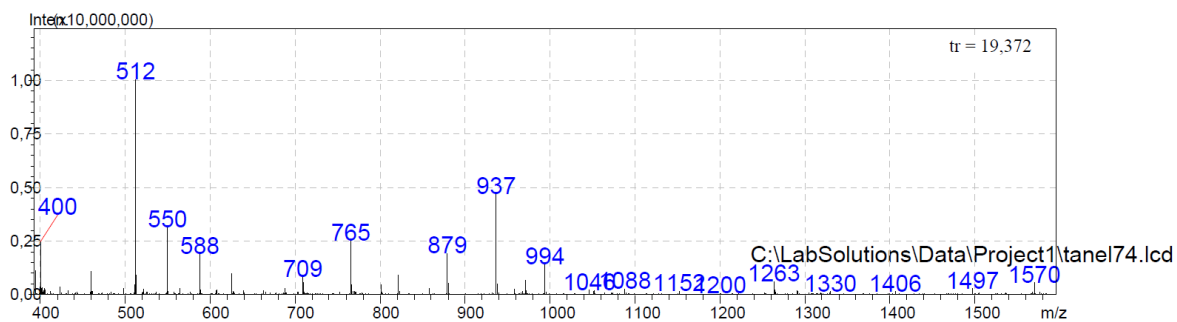
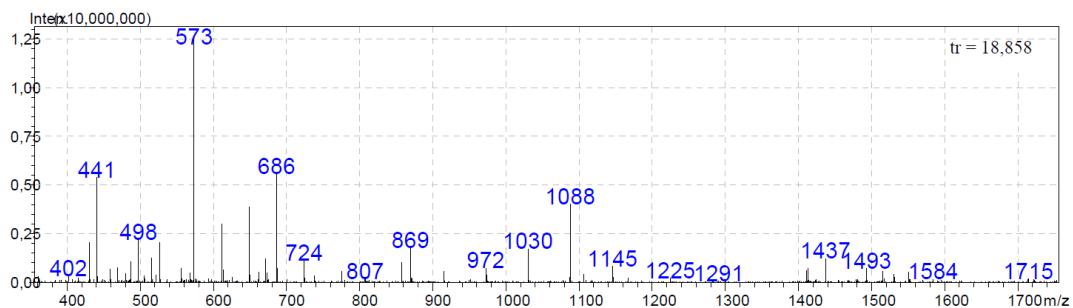
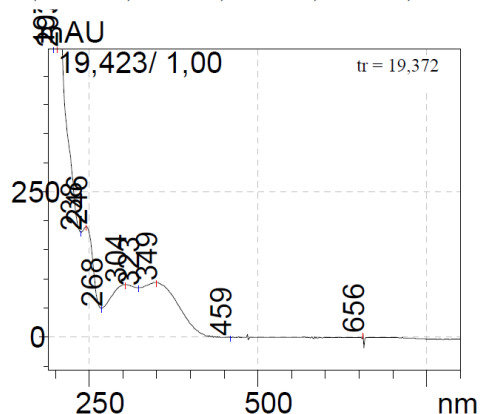
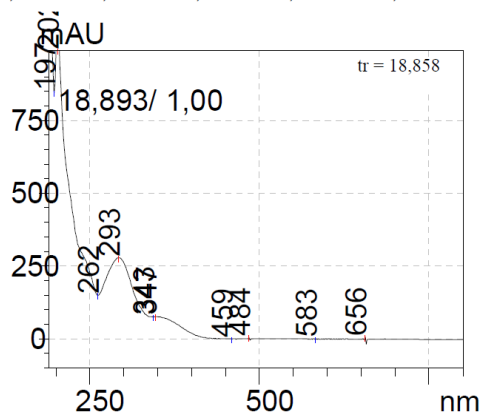
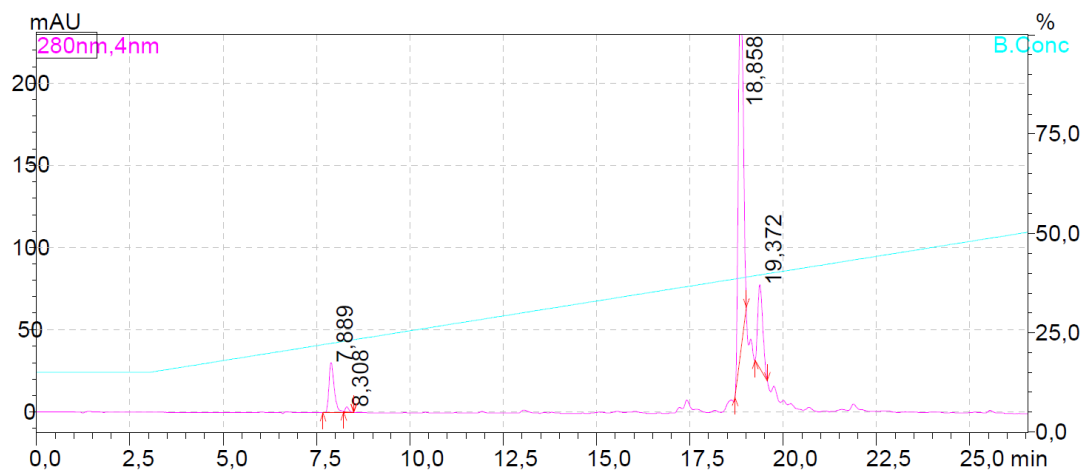
Sample ID:10-80 /33, Mw 1622



C:\LabSolutions\Data\Project1\Tanel1.lcd

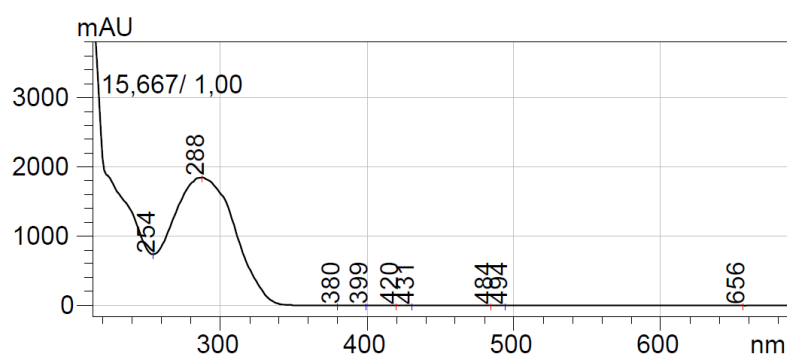
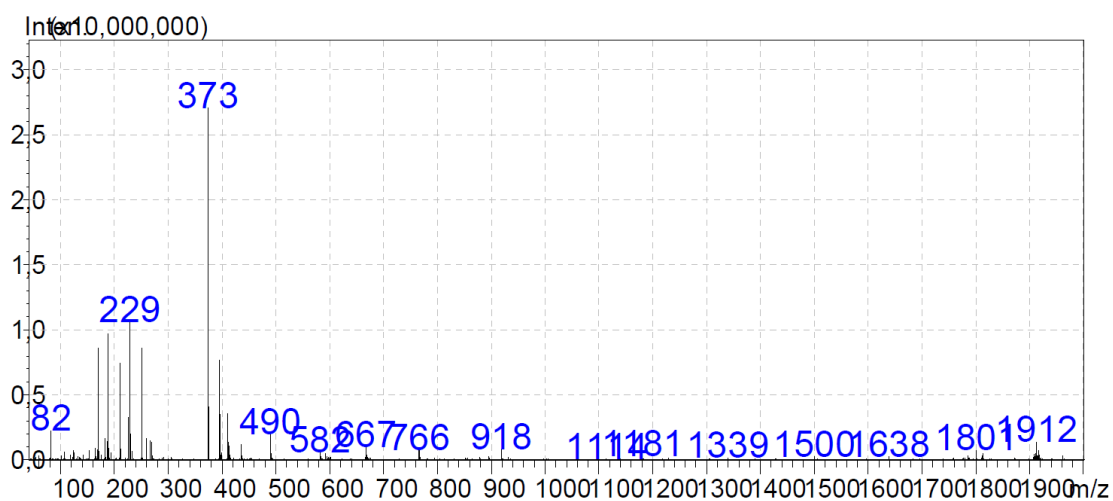
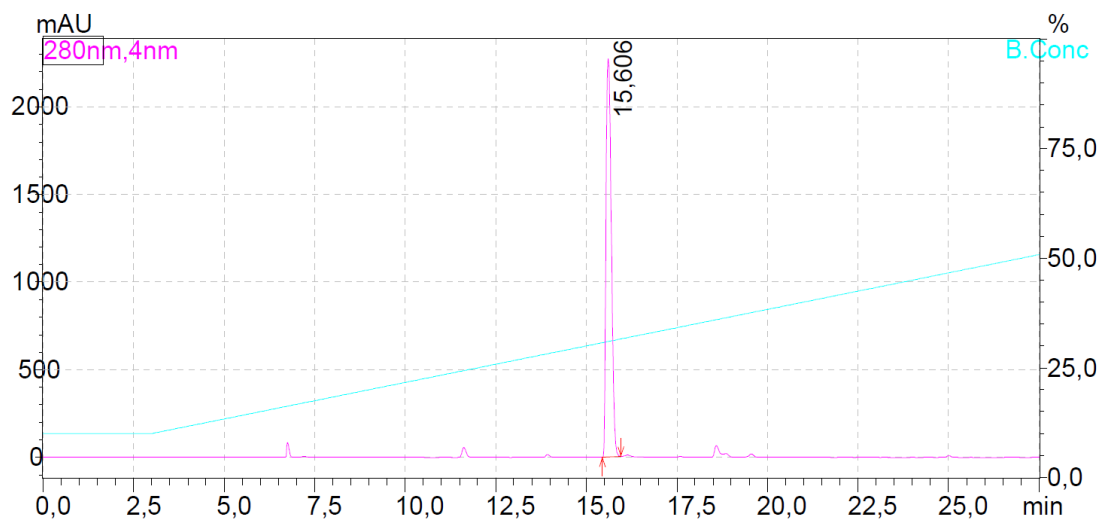
**Lisa 9.** Töös sünteesitud ARC-2103 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

**ARC-2103**  
Sample ID:15-60/30



**Lisa 10.** Töös sünteesitud ARC-2104 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

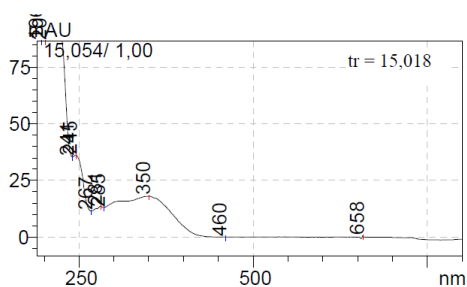
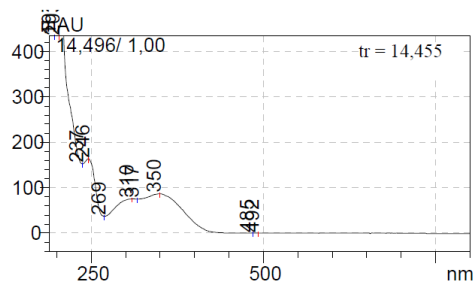
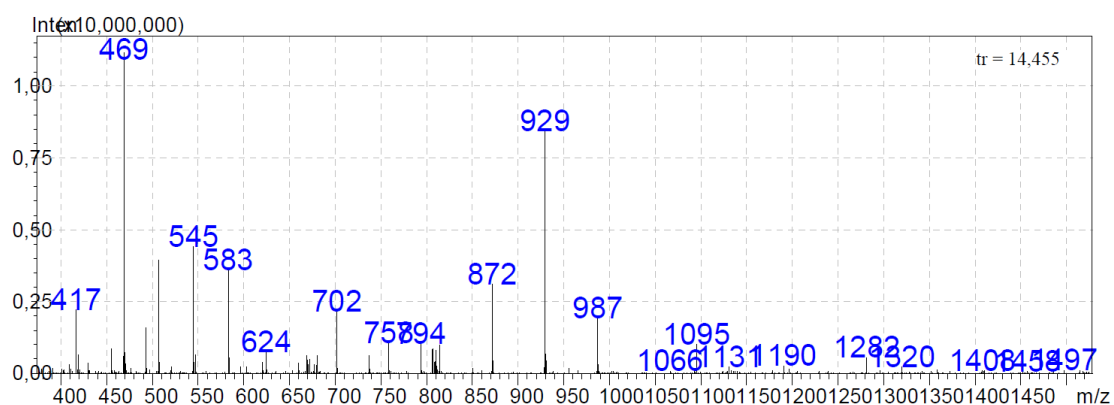
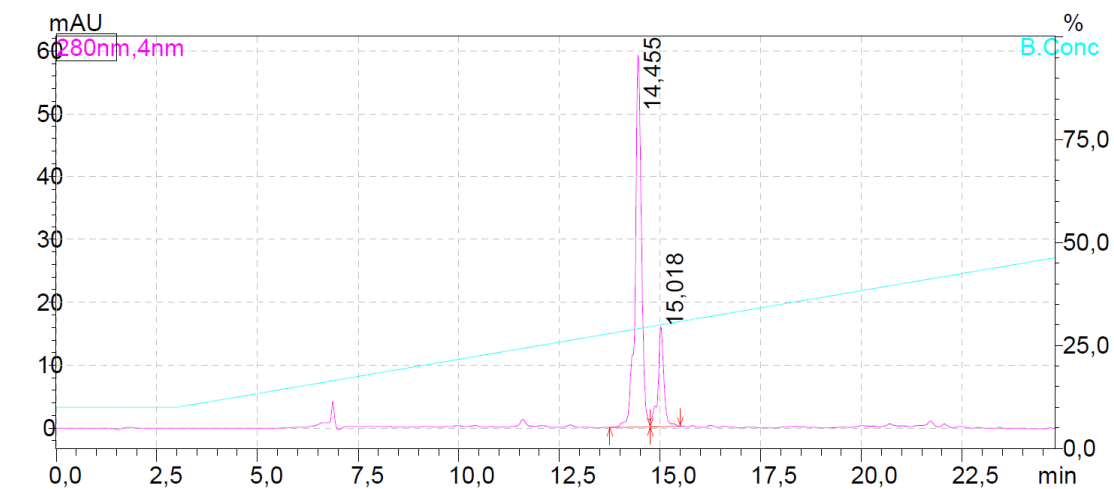
**ARC-2104**  
Sample ID:10-60/30



**Lisa 11.** Töös sünteesitud ARC-2105 HPLC kromatogrammid, MS- ja UV spektrid.

### ARC-2105

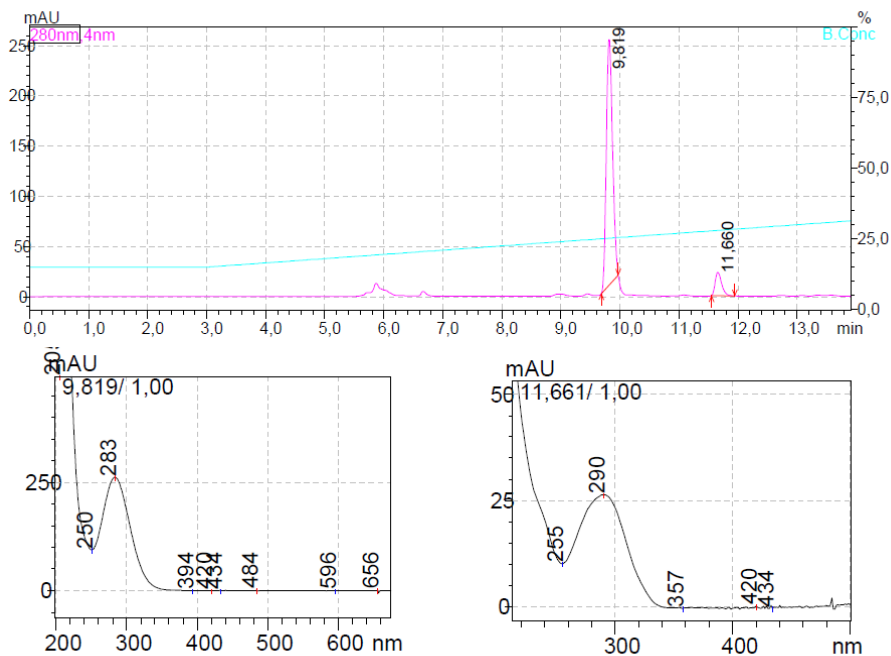
Sample ID:10-60/30



**Lisa 12.** Kiiritatud ARC-2103, ARC-2105 HPLC kromatogrammid ja UV spektrid (kahel lehel).

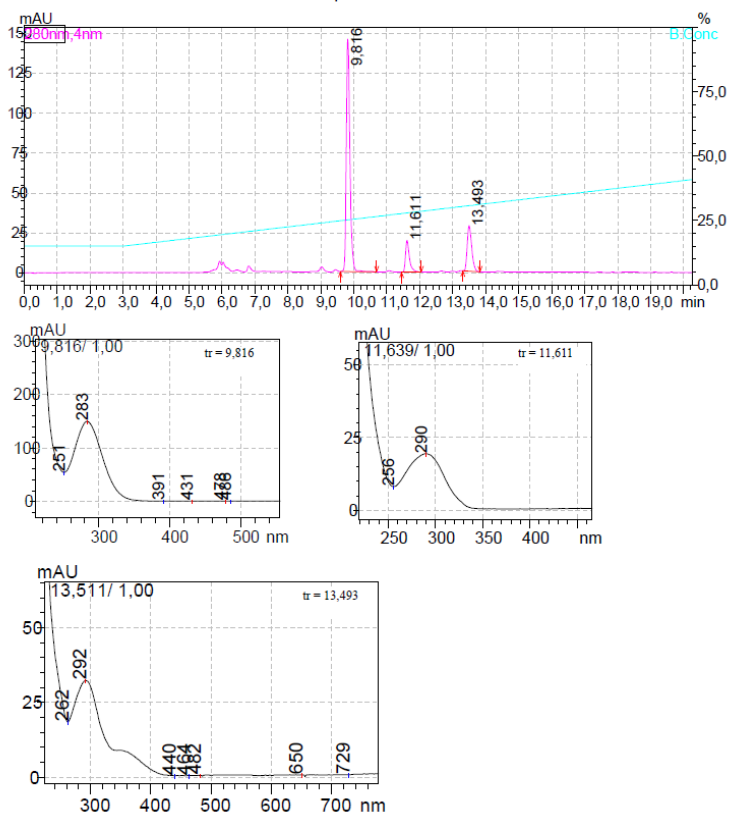
### Kiiritatud ARC-2103 (kiiritati 1 h)

Sample ID:15-60/30



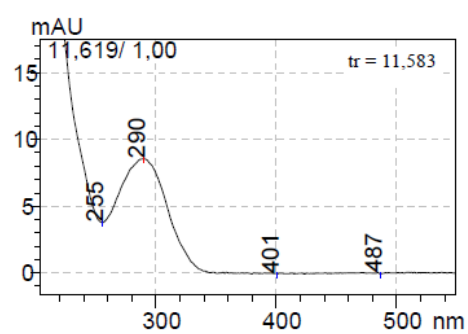
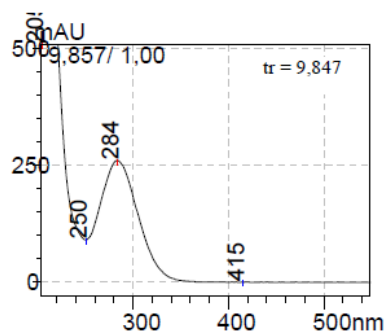
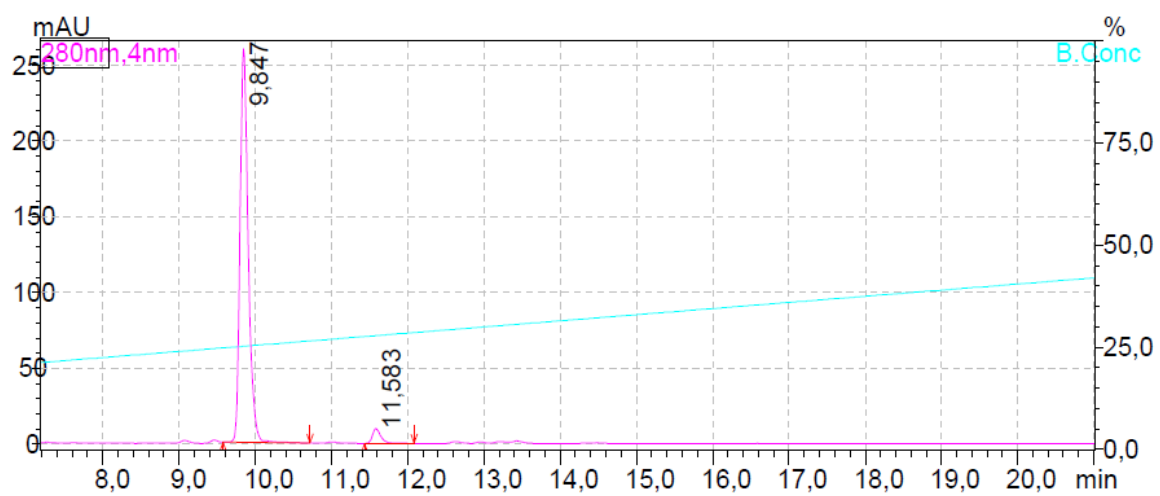
### Kiiritatud ARC-2103 ja kiiritamata ARC-2103 segu

Sample ID:15-60/30

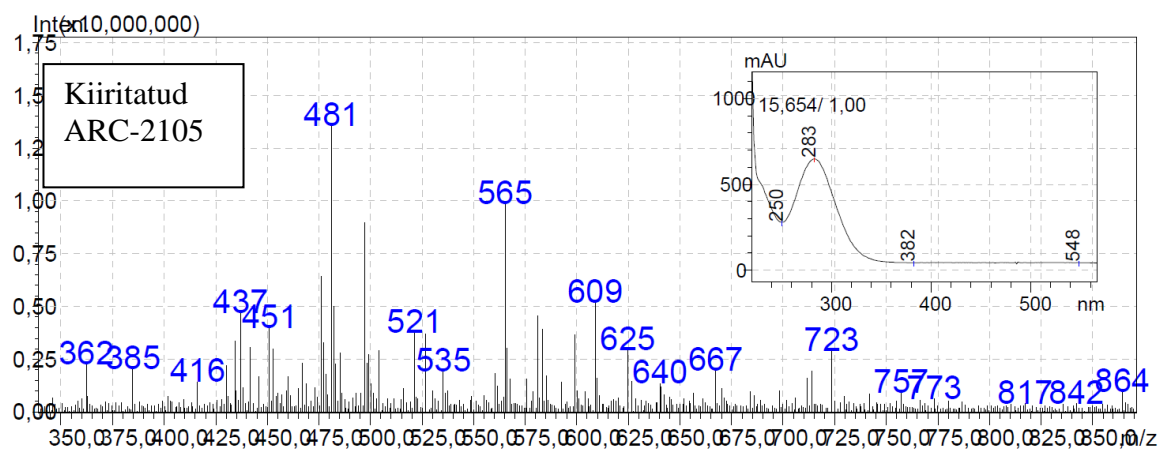
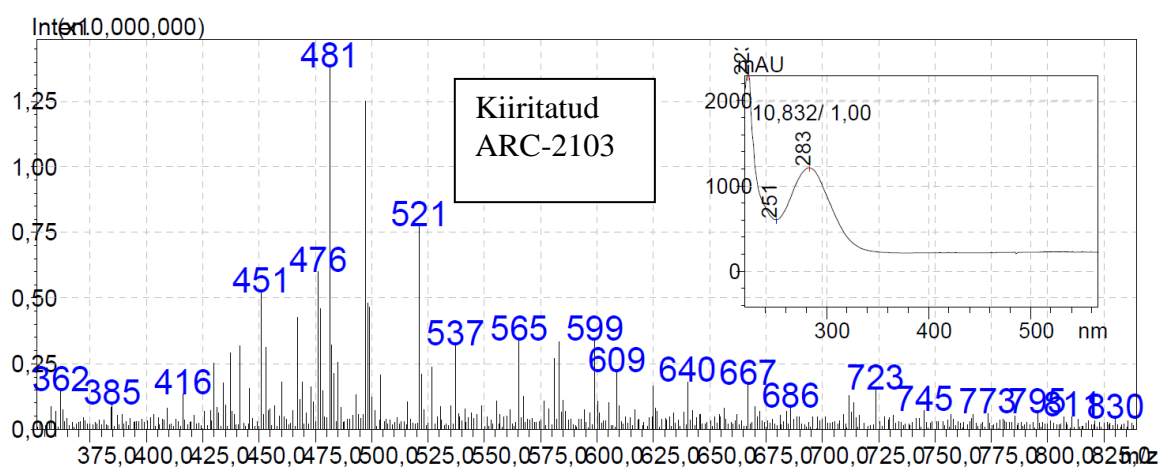
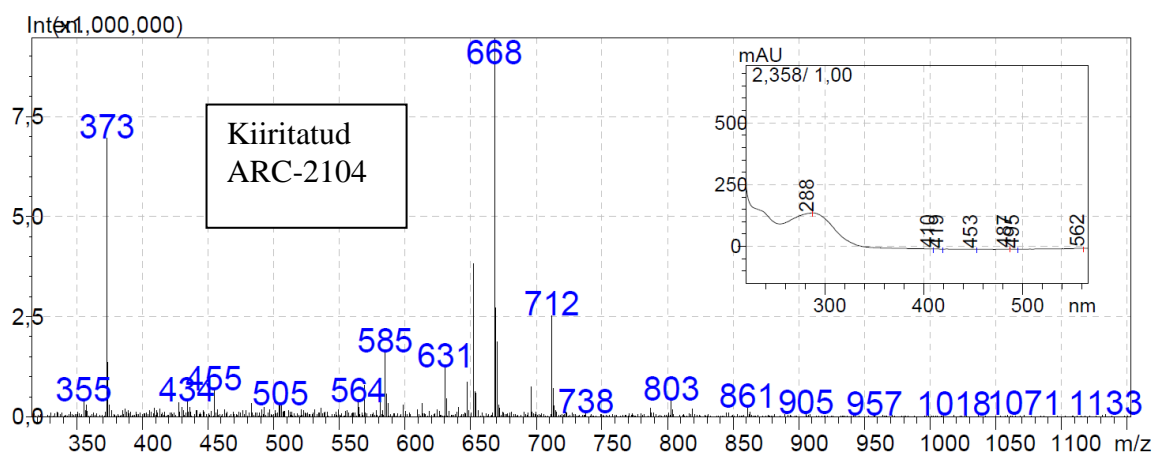




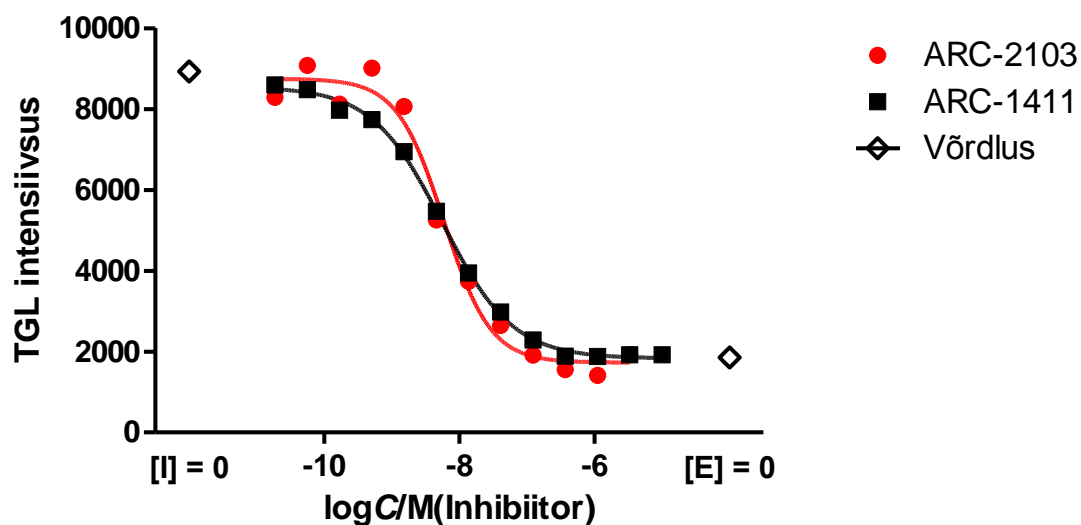
Kiiritatud ARC-2103 ja ARC-2105 segu  
Sample ID:15-60/30



**Lisa 13.** Kiiritatud ARC-2103 ja ARC-2105 massispektrid ja UV spektrid.

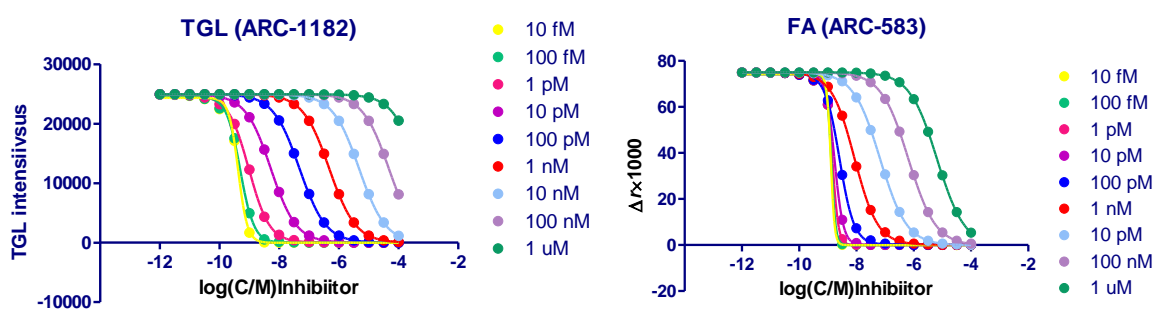


**Lisa 14.** Võrdlusaine ARC-1411 ja fotolaguneva aine ARC-2103 sidumiskõverad



**Lisa 14.** TGL mõõtmiste tulemused ARC-2103 võrdluses kirjanduses varem iseloomustatud ARC-1411-ga. PKAc lõppkontsentratsioon lahuses oli 1 nM, ARC-1182 sondi lõppkontsentratsioon oli 10 nM.

**Lisa 15.** Simuleeritud kõverad.



**Lisa 15.** Simuleeritud sidumiskõverad TGL ja FA meetodite puhul, kus on varieeritud uuritava inhibiitori  $K_D$  väärtused.

**Lisa 16.** Töös mõõdetud ARC-ide  $IC_{50}$  ja  $K_D$  väärtused koos struktuuridega, kus ülemisel real paikneb ATP-taskusse seonduv fragment (sinine), vahelüli (punane) ning peptiidne osa (roheline).

Tingimused a – TGL mõõtmised (PKA 1nM; ARC-1182 10 nM)

Tingimused b – FA mõõtmised (PKA 3nM; ARC-583 2 nM)

ARC nimetus	Struktuur	$IC_{50}$ [nM]	$K_D$ [nM]
ARC-1411	PIPY- -Nda- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$4 \pm 3^a$	$0,015 \pm 0,014^a$
ARC-2100	PIPY- -Nda-DAla-Ahx- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$23 \pm 11^a$	$0,034 \pm 0,030^a$
ARC-2103	PIPY- -Nda-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$18 \pm 6^a$	$0,039 \pm 0,021^a$
ARC-2103* ½ h	PIPY- -Nda-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$220 \pm 140^a$	$0,54 \pm 0,30^a$
ARC-2103* 1 h	PIPY- -Nda-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$400 \pm 240^a$	$0,66 \pm 0,50^a$
ARC-2103* 2 h	PIPY- -Nda-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$1600 \pm 550^a$	$2,1 \pm 0,9^a$
ARC-2103* 5 h	PIPY- -Nda-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$1200 \pm 540^a$	$2,6 \pm 0,1^a$
ARC-2104	PIPY- -Nda	$2500 \pm 21^b$	$430 \pm 6^b$
ARC-2105* 1 h	Ac-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$4200 \pm 64^b$	$670 \pm 20^b$
ARC-2104 : ARC-2105 segu* 1 h	PIPY-Nda : Ac-ANFA- -DArg <sub>6</sub> -Lys-NH <sub>2</sub>	$2300 \pm 120^b$	$350 \pm 22^b$
ARC-902	Adc- -Ahx- -DArg <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>	$19 \pm 12^b$	$2,8 \pm 1,8^b$

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, \_\_\_\_\_ TANEL SÕRMUS \_\_\_\_\_,  
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**cAMP-SÕLTUVA PROTEIINKINAASI  
FOTOLAGUNDATAV INHIBIITOR,**

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ KAIDO VIHT \_\_\_\_\_,  
(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **28.05.2015**